Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

Caracterização morfoanatômica e química de *Passiflora edulis* Sims *e Passiflora setacea* DC e seus mecanismos de cicatrização de feridas em ratos

Versão corrigida da dissertação conforme resolução CoPGr 5890.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção

do grau de mestre

Pós-graduanda: Ângela Rita de Almeida

Orientadora: Prof. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

A447c

Almeida, Ângela Rita de
Caracterização morfoanatomica e química de *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora setacea* DC e seus mecanismos de cicatrização de feridas em ratos / Ângela Rita de Almeida. -- São Paulo, 2014.
135p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Bacchi, Elfriede Marianne

1. Passifloraceae : Farmacognosia I. T. II. Bacchi, Elfriede Marianne, orientador.

615.323456 CDD

Ângela Rita de Almeida

Caracterização morfoanatômica e química de *Passiflora edulis* Sims *e Passiflora setacea* DC e seus mecanismos de cicatrização de feridas em ratos

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de mestre

Prof. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

Orientadora/presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

São Paulo, de

Dedico este trabalho a meus pais,

Alice e Armindo sem os quais

nada seria possível.

Agradecimentos

Aos membros da banca por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

À prof. Dra. Elfriede M. Bacchi por ter aceitado e confiado em minha proposta de trabalho e por todos os conselhos, orientação, amizade e carinho ao longo desta jornada.

À prof. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato pela contribuição inestimável na construção da parte botânica deste trabalho além da amizade e orientação recebidas.

Aos profs. Drs. Dominique Hermine Fischer e Paulo Chanel Deodato de Freitas pela amizade e conversas sempre produtivas no campo pessoal e profissional.

À Dra. Ana Maria Costa da EMBRAPA por ceder gentilmente os materiais vegetais empregados neste trabalho.

À prof. Dra Elaine Hatanaka da Universidade Cruzeiro do Sul por toda ajuda e orientação nos testes biológicos deste trabalho e pelo carinho em cada passo deste processo.

À prof. Dra Renata Gorjão da Universidade Cruzeiro do Sul pela ajuda nos testes biológicos com uso do citômetro de fluxo.

Ao prof. Dr. Paulo Moreno do Instituto de Química da USP pelo auxilio na identificação dos compostos químicos e pela contribuição no trabalho como um todo.

Á prof. Dra. Ligia Ferreira Gomes do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pelo uso dos microscópios com luz polarizada.

À prof. Dra. Terezinha de Jesus Pinto responsável pelo Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários, Produtos Afins e as Respectivas Matérias-Primas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - CONFAR®, pelas análises de endotoxinas.

As amigas e colegas da Central Analítica do Instituto de Química da USP, Alessandra, Cristiane e Janaina pelas analises de CLAE/DAD/MS e RMN e pela ajuda inestimável.

Aos colegas e amigos de laboratório da USP, Flávia, Alberto, Harry, Brunno, Leandro, Jessica, pela amizade e contribuição durante o trabalho. Um agradecimento especial à Flavia, Brunno e Alberto não só pela contribuição, mas também pelo carinho.

Aos colegas e amigos de laboratório do ICAFE (Instituto de Ciências de Atividades Físicas e do Esporte) da Universidade Cruzeiro do Sul: Maysa, Eleine, Leandro, Junior, Kim e

Vinicius por toda ajuda nos ensaios biológicos e pelos ensinamentos e colaboração de grande valia. Em especial à Maysa, Eleine e Leandro por todas as conversas e momentos de descontração tão importantes e caros.

Ao prof. Dr. Antônio Salatino do Departamento de Botânica da USP pelo empréstimo dos padrões de vitexina e orientina.

Ao técnico Roberto de Jesus Honório pelo carinho e colaboração durante o trabalho.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação David, Irineu, Elaine, Jorge e Bete pela paciência e esclarecimento de dúvidas.

À funcionária Leila Aparecida Bonadio da biblioteca do conjunto das Químicas pela revisão das referências bibliográficas.

Ao meu irmão e melhor amigo Fernando por toda paciência, atenção, companheirismo, carinho e apoio em todos os momentos de minha vida.

Á todos que contribuíram direta e indiretamente para a concretização deste trabalho

Muito obrigada!

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará a seu tamanho original".

Albert Einstein

Resumo

ALMEIDA, A.R. Caracterização morfoanatômica e química de *Passiflora edulis* Sims *e Passiflora setacea* DC e seus mecanismos de cicatrização de feridas em ratos. 2014. 135 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O uso de fitoterápicos é difundido na cultura popular dos países da América do Sul, substancialmente no Brasil. *Passiflora edulis* Sims (tipo de maracujá) está presente na lista da RENISUS e é uma espécie utilizada para promover a cicatrização de feridas cutâneas, no entanto, a literatura científica é pobre em relação aos mecanismos de ação da planta. *Passiflora setacea* DC é uma espécie silvestre de maracujá, sendo mais resistente à morte precoce e infecções por patógenos. Para este estudo procedemos à obtenção e fracionamento do extrato hidroetanólico a 60% das partes aéreas (folhas e caules) de *Passiflora edulis e Passiflora setacea*. Posteriormente, obtivemos o perfil cromatográfico em CCD e CLAE dos extratos e das frações, isolando os compostos majoritários e fizemos a análise da capacidade oxidativa dessas frações. Em uma segunda fase, verificamos a atividade cicatrizante dos extratos e das frações, em ratos, através da análise macroscópica do processo de cicatrização (área e tamanho do ferimento); análise da migração de neutrófilos (em bolsa de ar induzida no dorso dos animais) e mediadores inflamatórios liberados (TNF-α, IL-1β e CINC-2α/β) na bolsa de ar induzida. Os caracteres morfoanatômicos apresentados neste trabalho para *Passiflora setacea* irão contribuir para sua morfodiagnose e principalmente para sua distinção da *Passiflora* oficial brasileira, *Passiflora edulis*. A triagem fitoquímica demonstrou a presença de compostos fenólicos, tais como flavonoides e taninos e ausência de alcaloides, cumarinas e saponinas, nas duas espécies, *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*, sendo possível a diferenciação das duas espécies por técnica de CCD e CLAE. Na *Passiflora setacea* foi identificado um pico majoritário que não foi encontrado na *Passiflora edulis* e que com uso de técnicas de CLAE semi-preparativa, espectroscopia de massas e ressonância magnética nuclear, este composto foi identificado como sendo luteolina-8-C-ramnosil-glicosideo. Todos os resultados observados nas analises biológicas permitem concluir que estas duas espécies de Passifloras têm atividade cicatrizante e anti-inflamatória significativamente diversa dos sistemas empregados como controle e que podem constituir auxiliares importantes no preparo de futuros medicamentos para melhoria do processo de cicatrização.

Palavras chave: *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora setacea* DC, Citocinas, antioxidante, reparo tecidual, CLAE, neutrófilos, inflamação.

Abstract

ALMEIDA, A.R. **Morpho anatomic and chemical characterization of *Passiflora edulis* Sims *and Passiflora setacea* DC and their action in the cicatrization mechanisms of wounds in rats.** 2014. 135 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The use of herbal medicines is widespread in popular culture of the South American countries, substantially in Brazil. *Passiflora edulis* Sims (passion fruit) is present in the list of RENISUS and is a species used to promote healing of skin wounds; however, the scientific literature is low in relation to the mechanisms of action of the plant. *Passiflora setacea* DC is a wild species of passion fruit, being more resistant to early death and infection by pathogens. In the first part of this work, we obtained the 60 % extract of aerial parts (leaves and stems), of the two species, made the fractionation and phytochemical screening of *Passiflora edulis* and *Passiflora setacea*. We obtained the chromatographic profile of the extracts and fractions on TLC and HPLC, isolating the majority compounds and we made the analysis of the oxidative capacity of these fractions. In a second phase, we verified the healing activity of extract and fractions in rats by macroscopic analysis of the healing process (the area and size of injury); analysis of neutrophil migration (in air bag-induced on the backs of animals) and inflammatory mediators released (TNF-α, IL-1β and CINC-2 α/β) on the induced air bag. The macro and micro characters presented in this work for *Passiflora setacea* will contribute to its diagnose and mainly for its distinction of the official Brazilian Passionflower *Passiflora edulis*. The phytochemical screening demonstrated the presence of phenolic compounds such as flavonoids and tannins and absence of alkaloids, coumarins and saponins in *Passiflora edulis* and *Passiflora setacea*, being possible the differentiation of the two species by TLC and HPLC techniques. *Passiflora setacea* presented by HPLC a major peak that was not found in *Passiflora edulis* and using semi-preparative HPLC technique, mass spectroscopy and nuclear magnetic resonance, this compound was identified as luteolin-8-C-rhamnosyl-glucoside. All results observed in biological analyses lead to the conclusion that these two species of Passifloras have healing and anti-inflammatory activity significantly diverse from the control systems and they can be important in the preparation of future medications to improve the healing process.

Keywords : *Passiflora edulis* Sims and *Passiflora setacea* DC, cytokines, antioxidant, tissue repair, HPLC, neutrophils, inflammation.

Lista de Figuras

- Figura 1. *Passiflora edulis* Sims (flores e folhas) Fonte: http://odandy.blogspot.com.br/2007/04/passiflora-edulis.html 24
- Figura 2. Número de publicações encontradas na revisão da literatura em diferentes bases de dados (PubMed, Thomson e Scielo) com as palavras chaves: *Passiflora edulis* e inflamação, revisão inflamação com uso de Passifloras e Passifloras e cicatrização, em comparação com Passifloras em estudos envolvendo ansiedade, insônia e atividade ansiolítica - ano 2000 a 2013 25
- Figura 3. *Passiflora setacea* DC (flor, folhas e fruto) Fonte: http://www.brazilplants.com/passifloraceae/passiflora-setacea-ab.html 26
- Figura 4. Relação entre os tipos celulares e as fases da cicatrização (HATANAKA e CURI, 2007).. 29
- Figura 5. A **–** EMBRAPA CERRADOS - Rodovia Brasília/Fortaleza BR 20 Km 18 - Planaltina – DF e B - mapa do Brasil evidenciando a região do Cerrado.....41
- Figura 6. Reação de complexação de flavonoide com cloreto de de aluminio. (MABRY et al, 1970) 46
- Figura 7. Reação de DPPH• (radicalar) com um antioxidante (PISOSCHI et al , 2009) 48
- Figura 8. *Passiflora edulis* Sims - A = folha (face adaxial) e B = caules com gavinhas. Foto: A. R. Almeida 56
- Figura 9. *Passiflora edulis* conforme recebida - folhas, caules e gavinhas (planta seca) **-** Foto: A. R. Almeida**.** 57
- Figura 10. *Passiflora setacea* - planta fresca – A, B e C – vista desarmada da planta fresca com folhas, inicio de flores e gavinhas. Foto: A. R. Almeida 57
- Figura 11. *Passiflora setacea* – Folha*:* vista da face adaxial: glabra (A,B) com tricomas tectores no peciolo (C) e borda serrilhada (D). Fotos B,C e D - uso de lupa esteroscópica Wild Heerbrugg®. Foto: A. R. Almeida 58
- Figura 12. *Passiflora setacea* - Folha: vista desarmada da face abaxial: vários tricomas tectores em toda a extensão da folha e no pecíolo (A,B,C) e borda serrilhada (D). Fotos B, C e D - uso de lupa esteroscópica Wild Heerbrugg®. Foto: A. R. Almeida 58
- Figura 13. *Passiflora setacea* – pecíolo e nectários (A,B e C - vista dos nectários em lupa esteroscópica Wild Heerbrugg®.) Foto: A. R. Almeida 58
- Figura 14. *Passiflora setacea* - conforme recebida (planta seca - folhas e caules). Foto: A. R. Almeida.....58
- Figura 15. *Passiflora setacea* – Folha - (a) – vista frontal da epiderme foliar face adaxial, (b) - vista frontal da epiderme foliar face abaxial, com estômatos anomociticos (c) – vista frontal da epiderme foliar, face adaxial, evidenciando os campos primários de pontuação (pt), (d) – secção transversal da folha mostrando mesofilo dorsiventral com drusas (dr), (e) – secção transversal da folha com mesofilo com extensões de bainha (eb), (f) – tricomas (tr) tectores da face abaxial da folha. Coloração: Azul de astra Foto: A. R. Almeida 60
- Figura 16. *Passiflora setacea* - Folha: secção transversal da folha evidenciando a nervura central - (a) – visão da nervura central, (b) – região abaxial da nervura, com tricomas tectores, cutícula e colênquima, (c) – feixes vasculares colaterais abertos, (d)

– feixes vasculares e fibras perivasculares, (e) e (f) – fibras perivasculares (isoladas ou em grupos de 2-3). Coloração: Azul de astra e safranina. Foto: A. R. Almeida 61

- Figura 17. *Passiflora setacea* - Pecíolo: secção transversal - (a) – visão do pecíolo, (b), (c) e (e) – cutícula, colênquima, feixes vasculares e tricomas tectores (d) – drusas (dr) no parênquima cortical, (f) - amiloplastos (am). Coloração: Azul de astra e safranina. Foto: A. R. Almeida 62
- Figura 18. *Passiflora setacea* - Caule - secção transversal - (a) – visão do caule e dos feixes vasculares, (b) – cutícula, epiderme, colênquima e tricomas tectores, (c e d) – feixes vasculares colaterais abertos, (d) – drusas (dr) no floema, (f) – amiloplastos (am) no parênquima cortical. Coloração: Azul de astra e safranina. Foto: A. R. Almeida ... 63
- Figura 19. *Passiflora setacea* - (a) – nervura principal da folha de *Passiflora setacea*, tal qual (sem diafanização) e (b) – mesma nervura após tratamento com cloreto férrico. Foto: A. R. Almeida 70
- Figura 20. *Passiflora setacea* - (a) – caule da *Passiflora setacea* tal qual (sem diafanização) e (b) - mesmo caule após tratamento com cloreto ferrico. Foto: A. R. Almeida 70
- Figura 21. *Passiflora setacea* - Caule - (a) – caule sem polarização, (b) – mesma região do caule com polarização, (c) – região dos feixes vasculares do caule com raios xilemáticos com drusas, (d) – mesma região sob luz polarizada. Foto: A. R. Almeida 71
- Figura 22. CCD - Teste para alcaloides - Fase móvel = Cloroformio:MeOH:NH3 10% (80:40:1,5) Placa revelada com Dragendorff - (WAGNER e BLADT, 1996). Foto: A. R. Almeida 73
- Figura 23. Estruturas de rutina e quercetina (ANDERSEN e MARKHAM, 2006). 74
- Figura 24. CCD - Teste para flavonoides - (a) – Placa revelada com NP e visualizada em UV 366 nm e, (b) – Placa revelada com anisaldeído sulfúrico. Fase móvel 1: Acetato de etila: agua: acido acético: acido formico (100:26:11:11) Foto: A. R. Almeida 74
- Figura 25. CCD - Teste para flavonoides - (a) - Placa revelada com NP e visualizada em UV 366 nm e, (b) – Placa revelada com anisaldeido sulfúrico. Fase móvel 2: tolueno: formiato de etila: acido formico (50:40:10). Foto: A. R. Almeida 74
- Figura 26. CCD - Teste para taninos - Placa revelada com FeCl3 e ferricianeto de potássio. Uso de duas fase moveis consecutivas: Fase movel 1: alcool terc-butílico:acido acético:agua (3:1:1), Fase móvel 2: acido acético 6% (STHAL, 1967). Foto: A. R. Almeida 76
- Figura 27. Estrutura de alguns flavonoides C-glicosilados encontrados em *Passiflora edulis* (PEREIRA et al, 2005) 78
- Figura 28. Espectros UV de flavonoides glicosilados encontrados em *Passiflora edulis* - 1= isoorientina, 2= orientina, 3= isovitexina, 4= vitexina (ANDERSEN e MARKHAM, 2006). 78
- Figura 29. Mistura de padrões: vitexina e orientina. CLAE Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min de um gradiente linear de agua com 0,2% de acido formico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Cromatogramas obtidos a 330 nm 79
- Figura 30 - CLAE - Extrato bruto (EHEL) de *Passiflora edulis* - CLAE Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min de um gradiente linear de agua com 0,2% de acido formico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Cromatogramas obtidos a 330 nm 79

- Figura 31. CLAE - Fração aquosa de *Passiflora edulis* - CLAE Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min de um gradiente linear de agua com 0,2% de acido formico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Cromatogramas obtidos a 330 nm 80
- Figura 32. CLAE - Fração acetato de etila de *Passiflora edulis* - CLAE Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min de um gradiente linear de agua com 0,2% de acido formico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Cromatogramas obtidos a 330 nm 80
- Figura 33. Espectro de massas obtido para o pico com tempo de retenção de 16,6 min. CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Detector Bruker - Esquire 3000 Plus - Ion trap - 65 V - modo positivo - ESI 81
- Figura 34. Espectro de massas obtido para o pico com tempo de retenção de 17,3 min. CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Detector Bruker - Esquire 3000 Plus - Ion trap - 65 V - modo positivo - ESI 81
- Figura 35. Espectro de massas obtido para o pico com tempo de retenção de 20,5 min. CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Detector Bruker - Esquire 3000 Plus - Ion trap - 65 V - modo positivo - ESI 82
- Figura 36. Espectro de massas obtido para o pico com tempo de retenção de 23,5 min. CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Detector Bruker - Esquire 3000 Plus - Ion trap - 65 V - modo positivo - ESI 82
- Figura 37. Extrato bruto (EHEL) de *Passiflora setacea*. CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Cromatogramas obtidos a 330 nm 83
- Figura 38. Fração aquosa de *Passiflora setacea* - CLAE Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min de um gradiente linear de agua com 0,2% de acido formico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Cromatogramas obtidos a 330 nm 83
- Figura 39. Fração acetato de etila de *Passiflora setacea* - CLAE Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min de um gradiente linear de agua com 0,2% de acido formico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Cromatogramas obtidos a 330 nm 84
- Figura 40. Espectro de massas obtido para o pico com tempo de retenção de 19,9 minutos observado em *Passiflora setacea* - CLAE Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min de um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Detector Bruker - Esquire 3000 Plus - Ion trap - 65 V - modo positivo - ESI 85
- Figura 41. Espectro de RMN H^1 do composto separado por CLAE de *Passiflora setacea* em 19,9 minutos, com expansões para melhor visualização do espectro. Espectrofotômetro Bruker 500 MHz. Solvente = DMSO-d6..... 86

- Figura 42. Espectro de RMN C^{13} (125 MHz) do composto separado por CLAE de *Passiflora setacea* em 19,9 minutos com expansão evidenciando os carbonos da aglicona. Espectrofotômetro Bruker 500 MHz. Solvente = DMSOd6 87
- Figura 43. Curva de calibração usando vitexina para calculo de flavnoides totais em *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* 89
- Figura 44. Curva de calibração de Trolox ® utilizado como padrão externo para calculo da capacidade antioxidante dos extratos brutos e frações aquosas de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* 90
- Figura 45. Curva de calibração da porcentagem de redução de DPPH radical referente à concentração do padrão externo Trolox ® 91
- Figura 46. Curva da porcentagem de redução de DPPH radical referente à concentração do extrato bruto (EHEL) de *Passiflora edulis* 91
- Figura 47. Curva da porcentagem de redução de DPPH radical referente à concentração da fração aquosa de *Passiflora edulis* 91
- Figura 48. Curva da porcentagem de redução de DPPH radical referente à concentração do extrato bruto (EHEL) de *Passiflora setacea* 92
- Figura 49. Curva da porcentagem de redução de DPPH radical referente à concentração da fração aquosa de *Passiflora setacea* 92
- Figura 50. Dot plots (gráficos de pontos) e histogramas representativos obtidos no citômetro de fluxo para integridade de membrana e fragmentação de ADN para diferentes concentrações da fração aquosa dos extratos EHEL de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* 95
- Figura 51. Gráfico de barras para porcentagem de células com membrana integra referente à citotoxicidade de diferentes concentrações das fraçãoes aquosas de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* em neutrófilos de humanos, em relação à integridade da membrana celular..... 96
- Figura 52. Gráfico de barras para porcentagem de células com ADN integro referente à citotoxicidade de diferentes concentrações das frações aquosas de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* em neutrófilos de humanos, em relação à fragmentação de ADN. 96
- Figura 53. Gráficos de liberação de citocinas (IL-1 beta, TNF alfa e IL-8) frente à diferentes concentrações das frações aquosas de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* em neutrófilos de humanos, com e sem LPS. 97
- Figura 54. Média das áreas das feridas para o controle (carbopol®) e as duas Passifloras nos periodos inflamatório, de granulação e de remodelamento (n = 8 animais em cada grupo) 98
- Figura 55. Fotos das feridas dos grupos controle negativo (gel de carbopol®) e frações aquosas das duas Passifloras incorporadas no gel de carbopol a 1 % nos dias 0, 4 e 8, correspondendo ao inicio da ferida, fase de granulação e remodelamento, respectivamente (n = 8 animais em cada grupo) 99
- Figura 56. Áreas integradas das feridas abertas nos periodos inflamatório, de granulação e de remodelamento, para o controle e as frações aquosas das duas Passifloras (n = 8 animais em cada grupo) 99
- Figura 57. Velocidade de cicatrização dos grupos controle negativo (gel de carbopol®) e frações aquosas das duas Passifloras incorporadas no gel de carbopol® a 1 % (n = 8 animais em cada grupo) 100

- Figura 58. Boxplot - Contagem de neutrófilos em citômetro de fluxo, relacionando a quantidade de neutrófilos encontrdos no exsudato inflamatório e o tipo de tratamento utilizado (Os dados são provenientes da contagem de células em 7 animais por grupo) 102
- Figura 59. Média da contagem de células em citômetro de fluxo com os respectivos erros padrão. Mesmo experimento anterior (n = 7 animais em cada grupo) 103
- Figura 60. Comparação entre a liberação das citocinas mediante a aplicação de um dos 4 tratamentos (PBS, fração aquosa das duas espécies de Passifloras, LPS, LPS + fração aquosa das duas espécies de Passifloras). 104
- Figura 61. Estrutura e caminho de fragmentação para os 8-C-glicosideos orientina (R=OH) e vitexina (R=H), de acordo com a nomenclatura adotada por DOMON e COSTELO (1988), LI e CLAYES, (1994), e Ma et al (1997). Os sobrescritos representam as ligações que foram quebradas. (PEREIRA et al, 2005) 107
- Figura 62. Estrutura e caminho de fragmentação para os 6-C-glicosideos isoorientina (R=OH) e isovitexina (R=H), de acordo com a nomenclatura adotada por DOMON e COSTELO (1988), LI e CLAYES, (1994), e Ma et al (1997). Os sobrescritos representam as ligações que foram quebradas. (PEREIRA et al, 2005) 107
- Figura 63. Cromatograma obtido na CLAE de *Passiflora edulis* e espectro de massas correspondente aos picos com tempo de retenção de 16,6 e 17,3 minutos 109
- Figura 64. Cromatograma obtido na CLAE de *Passiflora edulis* e espectro de massas correspondente aos picos com tempo de retenção de 20,5 e 23,5 minutos 110
- Figura 65. Espectro de massas obtido para o pico observado a 19,9 minutos no EHEL e fração aquosa de *Passiflora setacea* e possiveis fragmentos. Equipamento Bruker Esquire 3000 - Ion trap - 65 V - modo positivo - ESI 112
- Figura 66. Quebras observadas para o composto obtido na CLAE de *Passiflora setacea* a 19,9 min. conforme Colombo et al, 2008 113
- Figura 67. Identificação dos picos majoritários encontrados nas duas Passifloras.... 115

Lista de Tabelas

- Tabela 1 - Diferenças macroscópicas e microscópicas principais entre *Passiflora edulis* e *Passiflora setace*a..... 64
- Tabela 2 - Material dissociado de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* 68
- Tabela 3 - Rendimento do extrato bruto de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* e das suas frações em agua e acetato de etila..... 77
- Tabela 4 - Deslocamentos de RMN de H^1 (500 MHz) e C^{13} (125 MHz) do composto isolado de *Passiflora setacea* (EHEL e fração aquosa) 88
- Tabela 5 - Teores de flavonoides totais expressos em vitexina em *Passiflora edulis* 89
- Tabela 6 - Teores de flavonoides totais expressos em vitexina em *Passiflora setacea.* 90
- Tabela 7 - Concentração efetiva (CE_{50}) do extrato bruto e da fração aquosa de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* obtidas no ensaio de determinação de atividade antioxidante com DPPH radicalar. 92
- Tabela 8 - Quantidade de endotoxinas encontradas no extrato (EHEL das duas Passifloras, em UE por mililitro (UE/mL), nanogramas por mililitro (ng/mL) e EU por quilo. 93
- Tabela 9 - Atividade cicatrizante de Passifloras em feridas abertas ratos (resultados = média de áreas ± desvios padrões de 8 animais em cada grupo) 100
- Tabela 10 - Ions de C-glicosilflavonas encontrados em extratos de Passifloras btidos em fragmentações MS/MS a 65 V – equipamento Esquire 3000 Plus - Bruker 108
- Tabela 11 - Identificação de picos obtidos na CLAE de *Passiflora edulis.* 111

Lista de abreviações

ADN = Ácido desoxirribonucleico
ADP = Difosfato de adenosina
ANVISA = Agencia nacional de vigilância Sanitária
AP1 = fator de transcrição proteína ativadora 1
CCD = Cromatografia em camada delgada
CE_{50} = Concentração efetiva para decaimento de 50% da absorção
CINC = Citocina quimioatraente de neutrofilos (cytokine-induced neutrophil chemoattractant)
CLAE = Cromatografia liquida de alta eficiência
DAD = Detector de arranjos de diodos
Delta (δ) = Deslocamento químico em RMN em ppm (parte por milhão)
DMSOd6 = Dimetil sulfoxido deuterado
DPPH = 2,2'-difenil-1-picril-hidrazila
EHEL = Extrato hidroetanolico liofilizado
ELISA = Teste imunoenzimático para detecção de anticorpos específicos (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERO = Espécie reativa de oxigênio
ESI = Ionização por electrospray (electrospray ionization)
eV = Electron volt - unidade de medida de energia
FDA = Food and Drug Administration
FL2 = Fluorescência alaranjada (λ = 560-580 nm)
FSC = Forward angle light scatter (luz desviada para frente)
G = Força centrifuga relativa
GpIb,IIb,IIIb = Glicoproteínas da superfície celular e do tecido conjuntivo
GPIX e GPV = Glicoproteinas plaquetárias
IL = Interleucina (IL1-β, IL-6, IL-8, etc)
IP = Iodeto de propídio
iNOS = Enzima óxido nítrico sintase induzida
J = Constante de acoplamento na RMN
LAL = Limulus amebocyte lysate
LPS = Lipopolissacarideo de *Escherichia coli*
MCP = Proteina quimioatraente de macrófagos
Min. = Minutos
MIP = Proteínas inflamatórias para macrófagos
MS = Espectroscopia de massas
NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NF-kB = Fator NF Kappa-B nuclear
nm = nanômetro
NO = Oxido Nitrico
NP = Ácido difenilbórico 2-amino etiléster
OMS = Organização Mundial da Saúde
PBS = Tampão de fosfato salino (phosphate buffered saline)
PDGF = Fator de crescimento derivado de plaquetas
ppm = Parte por milhão
psi = Libra força por polegada quadrada (pound force per square inch)
RENISUS = Relação nacional de plantas medicinais de interesse do SUS - ANVISA
RMN = Ressonância magnética nuclear
RPMI = Meio de cultura RPMI 1640 - Cultilab®
SBF = Soro bovino fetal

SSC = Single angle light scatter (luz desviada a 90º, em relação ao raio incidente)
SI = Sistema Internacional de Unidades
SUS = Sistema Único de Saúde
TGF = Fator de crescimento transformante
TNF = Fator de necrose tumoral
UE = Unidade endotóxica
UV = Ultra Violeta
V = Unidade de tensão elétrica do SI
VEGF = Fator de crescimento vascular endotelial
vWF = Fator de von Willebrand

Sumário

1. Introdução 21

2. Revisão bibliográfica 23
2.1. *Passiflora edulis* Sims 24
2.2. *Passiflora setacea* DC 26
2.3. Estrutura da pele 27
2.4. Mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de cicatrização 28
2.4.1. Fase de coagulação. 29
2.4.2. Fase inflamatória. 30
2.4.3. Fase de formação de tecido de granulação/proliferativa 31
2.4.4. Fase de remodelamento do tecido 32

3. Justificativa do trabalho 33

4. Objetivos 37

5. Metodologia 39
5.1. Coleta do material vegetal 40
5.2. Elaboração dos extratos 41
5.3. Estudo morfoanatômico 42
5.4. Triagem fitoquímica 43
5.5. Perfil cromatográfico e isolamento dos compostos majoritários 43
5.5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) 43
5.5.2 Cromatografia liquida de alta eficiencia (CLAE) 44
5.6. Quantificação de flavonoides totais 46
5.7. Atividade antioxidante 47
5.8. Endotoxinas 49
5.9. Ensaios biológicos 49

5.9.1. Cultura celular 50
5.9.1.1 Ensaio de integridade de membrana 50
5.9.1.2 Ensaio de fragmentação de ADN 52
5.9.2 Ensaio de ferida aberta 52
5.9.3 Ensaio de migração de neutrófilos em bolsa de ar estéril 53
5.10. Análise estatistica 54

6. Resultados 55
6.1. Descrição macroscópica – *P. edulis* Sims 56
6.2. Descrição macroscópica – *P. setacea* DC 57
6.3. Descrição microscópica – *P. edulis* Sims 59
6.4. Descrição microscópica – *P. setacea* DC 59
6.4.1. Folha – *P. setacea* DC 59
6.4.2. Caule – *P. setacea* DC 62
6.4.3. Dissociação do material vegetal 67
6.5. Testes histoquimicos 69
6.5.1. Nervura da folha de *P. setacea* DC 69
6.5.2. Caule de *P. setacea* DC 70
6.6. Triagem fitoquimica 71
6.6.1. Alcaloides 72
6.6.2. Flavonoides 73
6.6.3. Taninos 75
6.6.4. Saponinas 76
6.6.5. Cumarinas 76
6.7. Preparo do extrato bruto e das frações 77
6.8. Analises cromatograficas por CLAE/DAD/MS 77
6.9. Quantificação de flavonóides totais 89
6.10. Atividade antioxidante 90
6.11. Endotoxinas 93
6.12. Ensaios biológicos 94
6.12.1. Cultura celular 94

6.12.1.1 Ensaio de integridade de membrana e de fragmentação de ADN 94
6.12.1.2 Citocinas 97
6.12.2 Ensaio de ferida no dorso de ratos 98
6.12.3 Ensaio de migração de neutrófilos em bolsa de ar estéril 101
6.12.3.1 Contagem de células 102
6.12.3.2 Citocinas 104

7. Discussão 105

8. Conclusões 121

9. Referências bibliográficas 124

ANEXOS 133
Aprovação Comitê de Ética Universidade Cruzeiro do Sul 134
Aprovação Comitê de Ética Humanos Universidade Cruzeiro do Sul 135

Introdução

1. Introdução

A família Passifloraceae destaca-se entre os principais grupos vegetais nativos utilizados na medicina popular brasileira (CARLINI, 2003). O nome vulgar maracujá, de origem tupi-guarani, é empregado para designar diversas espécies de *Passiflora* L. cultivadas por seu valor ornamental, ou por suas propriedades medicinais e, mais destacadamente, pelos frutos apreciados na alimentação. A lista da RENISUS (Relação nacional de plantas medicinais de interesse do SUS – BRASIL ANVISA, 2010) inclui *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora edulis* Sims. Flavonoides como vitexina, isovitexina, apigenina, luteolina, quercetina, canferol, orientina e isoorientina foram repetidamente identificados, e os flavonóides chaftósido, isochaftósido, isovitexina, orientina e vitexina foram descritos como os principais de *Passiflora*.

Nas regiões interioranas do Brasil cataplasmas feitos com folhas de *Passiflora edulis* têm sido usados pela população como cicatrizante, para tratar infecções e inflamações cutâneas, sem a comprovação científica dos seus potenciais benefícios (GARROS et al, 2006).

No entanto, o uso indiscriminado de medicamentos sintéticos ou naturais, sem os necessários estudos de segurança, eficiência e eficácia, apresenta um grande risco à saúde (ROBINSON e ZHANG, 2011).

Das espécies vegetais que possuem atividade cicatrizante pode-se citar: *Aloe vera* (L.) Burm. f. *, Calendula officinalis* L. e *Matricaria chamomilla* L. (SILVA G., 1999, LEON SARABIA et al, 1999), porém pouco se sabe sobre os mecanismos farmacológicos envolvidos no processo de reparo tecidual mediados por plantas. Nesse sentido, no presente estudo pretende-se focar na atividade cicatrizante da *Passiflora edulis* Sims *e Passiflora setacea* DC e sua participação na fase inflamatória do processo de cicatrização.

Revisão bibliográfica

2. Revisão bibliográfica

2.1. *Passiflora edulis* Sims

O gênero *Passiflora* L. é considerado o mais importante da família Passifloraceae e consiste de cerca de 400 espécies (CRONQUIST, 1981). As espécies de *Passiflora*, conhecidas popularmente no Brasil como maracujás, apresentam uso tradicional importante como sedativos e ansiolíticos (BLUMENTHAL et al, 2000, DER MARDEROSIAN e BEUTLER, 2002). Apesar do caráter oficial de *Passiflora edulis* (figura 1) no Brasil, fazendo parte da RENISUS, os estudos com esta espécie são escassos, tanto em aspectos químicos quanto farmacológicos (GOSMANN et al, 2011).

Figura 1. *Passiflora edulis* Sims (flores e folhas).

Fonte: http://odandy.blogspot.com.br/2007/04/passiflora-edulis.html

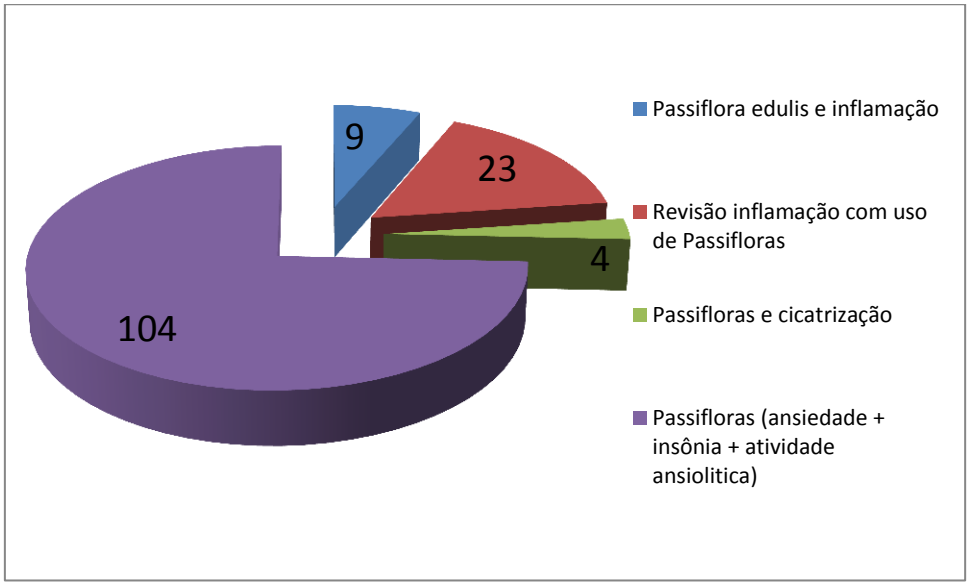
Gonçalves et al (2006) verificaram que o extrato hidroetanólico das folhas de *Passiflora edulis* diminuiu a inflamação aguda e aumentou a proliferação fibroblástica, a colagenização e a neoformação capilar na cicatrização da bexiga de ratos. Bezerra et al (2006) e Gomes et al (2006) também observaram que a administração pré-operatória do extrato hidroetanólico de folhas de *Passiflora edulis* influenciou de forma significativa na cicatrização das anastomoses colônicas e melhorou a cicatrização em laparotomias medianas em ratos.

Garros et al (2006) avaliaram a cicatrização de feridas abertas em ratos com a aplicação tópica de extrato hidroetanólico de *Passiflora edulis*, verificando que o uso tópico do extrato de folhas de *Passiflora edulis* não apresentou macroscopicamente efeito significativo na cicatrização de feridas na pele de ratos; entretanto microscopicamente apresentou aumento da proliferação fibroblástica no 7º dia e colagenização maior no 14º dia de pós-operatório.

.

Vale destacar que além dos trabalhos citados não existem outros na literatura que foquem nos aspectos celulares e moleculares envolvendo o mecanismo de ação dessa espécie na cicatrização. De uma forma geral existem pouquíssimos estudos disponíveis sobre o efeito de Passifloras no processo de cicatrização, sendo a maioria desses estudos encontrados em revistas brasileiras de pouco impacto e circulação restrita (Pub Med, Scielo e Thompson (Web of Knowledgement – figura 2).

Figura 2. Número de publicações encontradas na revisão da literatura em diferentes bases de dados (Pub Med, Thompson e Scielo) com as palavras chaves: *Passiflora edulis* e inflamação, revisão inflamação com uso de Passifloras e Passifloras e Cicatrização, em comparação com Passifloras em estudos envolvendo ansiedade, insônia e atividade ansiolítica – ano 2000 a 2013.



2.2. *Passiflora setacea* DC

Passiflora setacea é uma espécie de maracujazeiro (figura 3) muito apreciada em doces e sorvetes e é conhecida popularmente por maracujá-do-sono, maracujá-sururuca, maracujá de cascavel (OLIVEIRA, 2005). Porem esta espécie é pouco estudada, com quase nenhuma informação sobre sua composição química e efeitos medicinais. *Passiflora setacea* é uma espécie de passiflora silvestre sendo, portanto mais resistente à morte precoce e à outras doenças causadas por patógenos do solo (MENEZES et al, 1994, OLIVEIRA et al,1994, MELETTI e BRUCKNER, 2001, FISHER, 2003).

Figura 3. *Passiflora setacea* DC (flor, folhas e fruto)

Fonte: http://www.brazilplants.com/passifloraceae/passiflora-setacea-ab.htm

Além disto, pesquisas em andamento na EMBRAPA CERRADOS (projeto Rede Passitec – Desenvolvimento tecnológico para uso funcional das passifloras silvestres) indicam que, por meio de cruzamentos artificiais, podem ser obtidos híbridos férteis e promissores, entre *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*, com melhoria genética, produzindo mais sementes por planta, o que é muito interessante economicamente (JUNQUEIRA et al, 2004). Estas duas espécies são de interesse, pois as duas além de terem frutos comestíveis, *P. setacea* tem potencial farmacológico como *P. edulis*, por serem da mesma família.

2.3. Estrutura da pele

A pele é considerada o maior órgão humano, possuindo cerca de 1,5 a 2,0 m^2 no adulto médio. A pele se divide em três camadas: (SALMON et al, 1994, BRAFF et al, 2005 e WOLFF et al, 2008).

1. Epiderme - Camada superficial e bem fina. É formada por epitélio queratinizado, escamoso e estratificado, sem vascularização, cuja nutrição se efetua por difusão, através dos capilares situados na derme. A constituição essencial da epiderme é determinada pelas células denominadas queratinócitos. Formam a camada córnea que é anucleada, achatada, com 15 a 40 células empilhadas. A transformação de um queratinócito basal em um córneo se processa em torno de 26 a 42 dias nos seres humanos, acrescidos de cerca de 15 dias para descamação. A camada morta mais superficial é formada por queratina, que exerce uma barreira para germes patogênicos, além de ser quase impermeável a água.

Outras células presentes na epiderme são os melanócitos. Estes possuem organelas citoplasmáticas responsáveis pela síntese da melanina, a qual exerce papel importante na determinação da cor da pele e na sua proteção contra a ação dos raios ultravioletas excessivos.

Existem ainda na epiderme as células de Merkel, que possuem grânulos citoplasmáticos, os quais contêm substâncias neurotransmissoras, com suposto envolvimento na percepção da sensibilidade tátil.

2. Derme – Camada um pouco mais profunda e espessa, constituída por tecido conjuntivo, subdividindo-se em duas camadas: papilar e reticular. A diferença entre ambas consiste no fato de que a reticular é composta por fibras colágenas e fibroblastos, enquanto a papilar situa-se na linha divisória entre a derme e a epiderme, formando evaginações na forma de papilas. Estas possuem vascularização sanguínea e linfática, nervos e receptores sensitivos, terminações nervosas responsáveis pela percepção de diferentes tipos de sensibilidade: tátil,

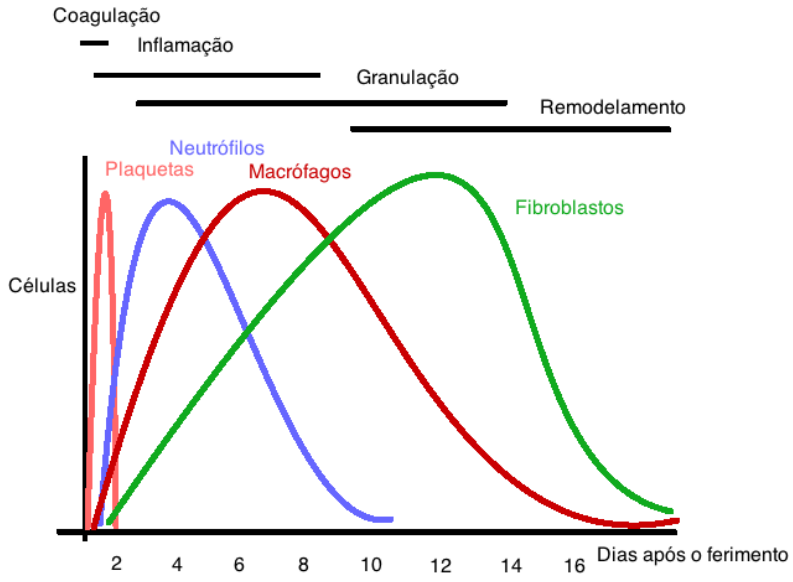
térmica e dolorosa. Nessa camada acham-se os folículos pilosos, os músculos eretores dos pêlos e as glândulas sebáceas.

3. Hipoderme - É constituída por tecido adiposo. Efetua a união dos tecidos vizinhos com a subcamada reticular da derme. Na junção dermo-hipodermica se acham localizadas as glândulas sudoríparas. Localizam-se na hipoderme as terminações nervosas, denominadas corpúsculos de Pacini, e os vasos sanguíneos, além de elementos celulares. A característica desse tecido é a de ser frouxo, o que lhe confere maleabilidade e elasticidade, com exceção das regiões palmares e plantares e dedos. A variação de sua espessura e a sua distribuição no organismo varia de acordo com o sexo e com a idade.

2.4. Mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de cicatrização

Cicatrização é o termo utilizado para definir o processo pelo qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado. O processo envolve componentes da matriz extracelular, células residentes (queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, células nervosas), leucócitos, e mediadores de natureza lipídica (prostaglandinas, leucotrienos, fator de agregação plaquetária) e proteica (citocinas, e fatores de crescimento) (HATANAKA e CURI, 2007). Didaticamente, o processo de cicatrização é separado em quatro fases: (I) **coagulação**, (II) **inflamação**, (III) **proliferação (formação de tecido de granulação)** e (IV) **remodelamento**. Estas fases não ocorrem isoladamente, trata-se de uma sequência de eventos celulares, teciduais e bioquímicos organizados para restabelecer o tecido após a lesão.

Figura 4. Relação entre os tipos celulares e as fases da cicatrização (HATANAKA e CURI, 2007).



2.4.1 Fase de coagulação.

A fase de coagulação compreende todo o processo envolvido na formação de coágulos de sangue que estancam o extravasamento de sangue para os espaços extravasculares após a lesão vascular inicial. Este processo depende da interação entre plaquetas, fatores de coagulação e a parede dos vasos sanguíneos. A fase de coagulação inicia-se com a exposição do tecido conjuntivo subendotelial que promove a adesão de plaquetas através da interação entre as glicoproteínas da superfície celular (GpIb e GpIIb/IIIa) e do tecido conjuntivo. Adicionalmente uma proteína circulante chamada fator de von Willebrand (vWF) une glicoproteínas plaquetárias (GpIb, GPIX e GPV) as fibrilas de colágeno, contribuindo na adesão de plaquetas ao endotélio. Isso resulta na ativação das plaquetas com liberação de conteúdos armazenados nos grânulos plaquetários (ADP, serotonina, fator de ativação plaquetária, vWF, o fator 4 plaquetário, e tromboxano A2) na corrente sanguínea, o que resulta em amplificação da ativação plaquetária inicial. O tromboxano A2 liberado tem atividade vasoconstritora e o difosfato de adenosina (ADP) induz a agregação de plaquetas o que forma o tampão hemostático primário. Adicionalmente, o receptor GpIIb/GpIIIa liga fibrinogênio permitindo a agregação plaquetária. A formação de um tampão secundário pode ser iniciada por duas maneiras diferentes: a via de ativação por contato (intrínseca) e via do fator tecidual (extrínseca). Estas duas vias convergem a um ponto final

comum que compreende a conversão da protrombina em trombina, e forma um tampão hemostático mais estável. A coagulação é limitada ao tecido ferido por inibidores da coagulação, tais como a antitrombina, trombomodulina e do sistema fibrinolítico. Distúrbios da coagulação resultam em hemorragias e ou trombose na área da lesão (TERKELTAUB, 1998).

Após a lesão e ativação, as plaquetas liberam grandes quantidades de fatores como: o fator de crescimento de plaquetas (PDGF), levando a quimiotaxia de leucócitos. Os fatores de crescimento transformante beta (TGF-β, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3) também são liberados pelas plaquetas e desempenham um papel importante no presente processo. TGF-β1 é secretado pelas plaquetas, pelos macrófagos e fibroblastos imediatamente após a lesão e desempenham um papel central na infiltração de neutrófilos (a marca da fase inflamatória) (CLARK e HERSON, 1988, GRINNEL et al, 1981).

2.4.2 Fase inflamatória

A fase inflamatória tem duração de aproximadamente 24 a 72 horas e caracteriza-se pelo aparecimento dos sinais clássicos da inflamação como dor, calor, rubor e edema. Os mediadores químicos inicialmente liberados por plaquetas e mastócitos provocam vasodilatação, aumentam a permeabilidade dos vasos e favorecem a quimiotaxia principalmente de neutrófilos e monócitos/macrófagos que tem como função combater os agentes invasores e realizar a fagocitose dos produtos resultantes da lise tecidual (MOLLÍNEDO et al, 1999). A exposição das células aos patógenos e a lesão tecidual resultam na produção e na liberação de diversos mediadores químicos, responsáveis pelas características da área inflamada. Dentre os mediadores da inflamação encontram-se histamina, metabólitos do acido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), fator de ativação plaquetária, bradicinina, óxido nítrico, neuropeptídios e citocinas. Neutrófilos estão intimamente envolvidos com as reações de formação de tecidos através da produção de fatores de crescimento e citocinas, responsáveis pela recomposição da celularidade regional e restabelecimento da homeostasia tecidual (MOLLÍNEDO et al, 1999). A chegada de leucócitos ao local da inflamação depende de substâncias

quimioatraentes como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). As moléculas da família do fator de crescimento transformante beta (TGF-β): TGF- β1, TGF- β2 e TGF- β3 também participam nesta fase do processo. A fase inflamatória também é modulada por quimiocinas como as proteínas inflamatórias para macrófagos (MIP), a proteína quimioatraente de macrófagos-1 (MCP-1), e a interleucina 8 (IL-8) (GILLITZER e GOEBELER, 2001). No sítio da inflamação, neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), que são de vital importância na atividade microbicida e inflamatória destas células. (BABIOR, 1999; BORREGAARD et al, 1993).

Neutrófilos estão envolvidos com as reações de formação de tecidos através da produção de EROs, quimiocinas, fatores de crescimento (VEGF-α) e citocinas (TNF-α, IL-1β, IL-8), responsáveis pela recomposição da celularidade regional, restabelecimento da homeostasia tecidual e sinalização para o inicio da fase seguinte (MOLLINEDO et al, 1999).

2.4.3 Fase de formação de tecido de granulação/proliferativa

Na fase proliferativa ocorre neoangiogênese, produção de colágeno jovem pelos fibroblastos e intensa migração celular (principalmente queratinócitos), promovendo a reepitelização. Inicialmente, a migração e ativação de fibroblastos são intensificadas em decorrência da liberação de mediadores principalmente, por macrófagos, destacando-se fatores de crescimento como TGF-α (Fator de crescimento transformante-alfa) e VEGF-A (Fator de crescimento vascular – endotelial – A). O aumento do número de fibroblastos é conhecido como fibroplasia. Sua eficiência é dependente da ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos (KNIGHTON et al, 1981; HARTLAPP et al, 2001).

Sob estímulo de fatores de crescimento e de outros mediadores, as células endoteliais do interior de capilares intactos nas margens da ferida passam a secretar colagenase e ativador do plasminogênio (WERNER e GROSE, 2003). As células epidérmicas entram imediatamente em processo mitótico, formando uma cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa (GUIDUGLI-NETO, 1987). Os queratinócitos nesta fase tornam-se células hiperproliferativas e migratórias que

produzem e secretam componentes da matriz extracelular e polipeptídeos sinalizadores, ao mesmo tempo em que seu citoesqueleto é alterado para a produção de queratina (MONTESANO e ORCI, 1988).

2.4.4 Fase de remodelamento do tecido

A fase de remodelamento pode durar de meses a anos. Nesta fase, ocorre reorganização do colágeno e aumento da resistência da cicatriz, que adquire maior força tênsil e empalidece. Quando a ferida completou o seu fechamento e os microrganismos foram eliminados, os linfócitos constituem o subsistema leucocitário mais abundante em feridas humanas (CLARK e HERSON, 1988). Os linfócitos não são somente efetores imunes, mas também, produtores de fatores de crescimento (ENGELHARD et al, 1998).

O remodelamento envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição de colágeno é feita a principio de maneira aleatória tendo como orientação a organização da fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subsequentemente digeridas pela colagenase, novamente sintetizadas e arranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes. Essas ligações são formadas entre moléculas de tropocolágeno no âmbito da fibrila e entre as outras fibrilas. Repetições sucessivas de lise, síntese, direcionamento e ligação formam fibras maiores de colágeno, resultando numa configuração mais regular da cicatriz. Isto aumenta a sua resistência devido à organização das fibras acompanhar as forças mecânicas a que o tecido está sujeito durante a atividade normal. Ao final desta etapa, os anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente e as cicatrizes são hipo-vascularizadas devido ao desaparecimento dos neocapilares. Uma ferida somente pode ser considerada resolvida depois de concluída a maturação e remodelagem da matriz extracelular.

Os eosinófilos aparecem nas últimas fases do reparo e presume-se que podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento (BLOTNIK et al, 1994).

Justificativa do trabalho

3. Justificativa do trabalho

Para que o potencial de uso da biodiversidade brasileira se transforme em alimentos e produtos disponíveis para a população urbana, faz-se necessária a geração simultânea de tecnologias e informações em várias áreas do conhecimento para subsidiar todos os elos da cadeia produtiva de forma sustentável.

O Brasil é centro de diversidade do gênero *Passiflora* com mais de 150 espécies (CUNHA et al., 2002). Apesar dos diversos benefícios atribuídos ao gênero para a melhoria da saúde, apenas três espécies são utilizadas pela indústria. Dentre elas, somente *Passiflora edulis*, o maracujá azedo, atende ao mercado de alimentos.

Com a finalidade de fornecer conhecimentos mínimos, mas suficientes, para que os frutos e folhas de outras espécies do gênero cheguem à população de forma segura, a rede Passitec em sua Etapa I ("Desenvolvimento tecnológico para uso funcional das Passifloras silvestres" - infoseg 02080500500) integrou diferentes áreas do conhecimento e gerou um conjunto de tecnologias sustentáveis para os elos da cadeia produtiva.

Nesta etapa a rede da Embrapa trabalhou, principalmente, as variedades de *Passiflora alata* Curtis, *Passiflora setacea* DC*, Passiflora tenuifila* Killip e *Passiflora nítida* Kunth.*,* resultantes das pesquisas da Rede de Melhoramento Genético do Maracujazeiro - Embrapa Cerrados. Estas cinco espécies foram escolhidas por apresentarem maior potencial de mercado pelas propriedades benéficas dos frutos à saúde (COSTA e LIMA, 2010). No nosso caso a ênfase foi dada as espécies *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea,* pois além destas serem as duas espécies com os frutos apreciados na alimentação, *Passiflora edulis* já tem comprovada ação farmacológica e *Passiflora setacea* por ser do mesmo gênero, pode ter algum potencial farmacológico.

Na área química a EMBRAPA realizou a quantificação e caracterização de alguns compostos de interesse funcional. Foram confirmadas propriedades benéficas para o sistema nervoso da polpa de *Passiflora setacea* obtida pelo método da Embrapa.

Outra forma de aplicação clínica de *Passiflora edulis* é seu preparo como cataplasma e loção, usado para tratar infecções e inflamações cutâneas. A despeito do seu uso frequente pela população, não foram identificados estudos científicos avaliando a possível eficácia das Passifloras quando aplicadas localmente em feridas abertas (GARROS et al, 2006, PEREIRA e VILEGAS, 2000).

A proposta de continuidade do projeto da EMBRAPA também foca a longevidade e segurança dos produtos *in natura* e processados e enfatiza a pesquisa de efeito biológico e composição de bioativos. Os resultados subsidiarão o registro de produtos de acordo com a legislação vigente. Para viabilizar as ações, a rede conta com a colaboração efetiva de 27 instituições, entre as quais a Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. O objetivo final é que a sociedade usufrua dos benefícios propiciados pelos alimentos promotores de saúde.

No uso das Passifloras como cicatrizantes o conhecimento dos mecanismos pelos quais *Passiflora edulis e Passiflora setacea* interferem nas fases de reparo tecidual é essencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Desta forma, este estudo visa definir possíveis efeitos destas duas espécies de Passifloras na fase inflamatória do processo de cicatrização de feridas.

Nesse sentido, utilizaremos neutrófilos, pois estas células estão envolvidas com as reações catabólicas de degradação de tecidos através da produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; apresentam atividade no processo de angiogênese e formação de tecidos através da produção de fatores de crescimento e liberação de citocinas (PARK e BARBUL, 2004; GILLITZER e GOEBELER, 2001; WERNER e GROSE, 2003). Sabe-se que a produção excessiva de citocinas e de espécies reativas de oxigênio por leucócitos pode levar à lesão tecidual e a morte celular. Sendo assim, a hiper ou hiporresponsividade encontrada em células tratadas com *Passiflora edulis e Passiflora setacea* pode desencadear ativação apropriada, contribuindo para o processo de cicatrização, ou inapropriada, aumentando a susceptibilidade do organismo a micro-organismos invasores. Neste aspecto, acreditamos na importância de estudos que verifiquem se *Passiflora edulis e Passiflora setacea* afetam a migração de neutrófilos, a liberação de citocinas importantes no processo como TNF-alfa, IL-1beta e CINC-2α/β, bem como seu potencial antioxidante.

Vários pontos são relevantes quando consideramos que *Passiflora edulis e Passiflora setacea* contêm substâncias que podem regular o processo de regeneração do tecido. Por exemplo, para otimizar a intervenção terapêutica, torna-se necessário o conhecimento prévio do efeito do fármaco na cronologia da lesão, a fim de maximizar os efeitos benéficos do tratamento.

Extratos de origem vegetal são utilizados em ferimentos, principalmente em países da América Latina (CARDOSO et al, 2004). O grupo da EMBRAPA também tem como meta avaliar a segurança de consumo e eficácia biológica de pelo menos dois ingredientes/produtos elaborados com Passifloras de acordo com as possíveis propriedades biológicas dadas pela composição química e uso popular disseminado.

Nossa perspectiva futura é de que, se houver efeitos benéficos, estes sejam evidenciados, bem como o mecanismo envolvido determinado. Além disso, será possível desenvolver formulações (biomembranas, géis, pomadas) para uso humano.

Objetivos

4. Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi verificar a atividade cicatrizante de *Passiflora edulis e Passiflora setacea*, focando no estudo da fase inflamatória do reparo tecidual e nas funções de neutrófilos através de ensaios *in vivo*.

Para tal empregaremos os seguintes passos:

- Obtenção do extrato hidroetanólico a 60% das partes aéreas (caules e folhas) de *Passiflora edulis e Passiflora setacea*;
- Fracionamento dos extratos hidroetanólicos com acetato de etila e água;
- Identificação morfoanatômica macro e microscópica;
- Triagem fitoquímica dos extratos e das frações;
- Obtenção do perfil cromatográfico em CCD e CLAE dos extratos e das frações;
- Isolamento e identificação dos compostos majoritários;
- Análise de endotoxinas *in vitro*
- Análise da citotoxicidade *in vitro* em neutrófilos com contagem de células e determinação de integridade de membrana e taxa de fragmentação de ADN e dosagem de citocinas (SEILER et al, 2004).
- Verificação da atividade cicatrizante do extrato e das frações, após a indução de ferimento em ratos, através da análise macroscópica do processo de cicatrização (área e tamanho do ferimento); análise da migração de neutrófilos em bolsa de ar induzida no dorso e mediadores inflamatórios liberados (TNF-α, IL-1β e CINC-2α/β) na bolsa de ar induzida em ratos.

Metodología

5. Metodologia

5.1. Coleta do material vegetal

As folhas e ramos de *Passiflora edulis* Sims, hibrido BRS, gigante amarelo, foram obtidas de uma área de plantio experimental comercial, em DF Planaltina (2) – Núcleo Rural do Pipiripau, conforme coordenadas 15°32'30.08"S; 47°31'14.59"O, pela EMBRAPA CERRADOS para avaliação de cultivo e condução de pragas e doenças, serviços ambientais. O plantio foi conduzido em sistema convencional (OLIVEIRA e RUGGIERO, 2005). A idade do plantio foi de 3 anos com a colheita em final de ciclo. Os ramos terminais estavam com folhas verdes entre 0,2 a 1 m de comprimento, na porção mediana da planta.

Data de colheita da amostra *Passiflora edulis*: 06 de Setembro de 2012 (período seco - estresse hídrico pela baixa umidade relativa do ar).

Área de avaliação de *Passiflora setacea*: Palmas – Tocantins. Região centro leste do Tocantins – Santa Teresa do Tocantins. Coordenadas em UTM 8.872.129 mN, 8.857.794 mN,182.305 mE e 225.710 mE. – Área com ensaios para ajuste de tratos culturais, sistema de condução e cultivo. Ramos com folhas verdes entre 0,2 a 0,4 m de comprimento, na porção mediana da planta.

Data de colheita da amostra *Passiflora setacea*: 12 de março de 2012.

Estas espécies vegetais fazem parte do projeto Rede Passitec – Desenvolvimento tecnológico para uso funcional das passifloras silvestres, da EMBRAPA CERRADOS – Projeto Infoseg 02080500500 e registro CGEN 02000.002921/2008-6.

Figura 5 – A – EMBRAPA CERRADOS - Rodovia Brasília/Fortaleza BR 020 Km 18 - Planaltina – DF e B – mapa do Brasil evidenciando a região do Cerrado .

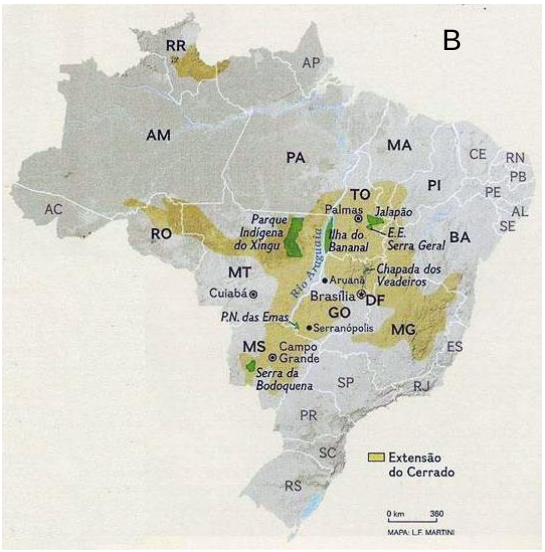


Foto: EMBRAPA CERRADOS – Brasilia/Fortaleza BR 020 Km 18

5.2. Elaboração dos extratos

As partes aéreas das espécies vegetais *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* foram rasuradas e secas em estufa com circulação de ar a 40° C e pulverizadas em moinho de facas e martelos (tamis de 1 mm). Os extratos hidroetanólicos a 60% foram obtidos por percolação das drogas vegetais, segundo o método A da Farmacopéia Brasileira 2° ed (1959). Os extratos hidroetanólicos foram concentrados à pressão reduzida em evaporador rotativo Buchi R-114 à temperatura de 40º C, resultando nos extratos brutos de cada espécie. A água remanescente nos extratos brutos foi retirada por liofilização, em liofilizador LK4, da marca Edwards do Brasil, produzindo os extratos hidroetanólicos liofilizados (EHEL) de cada *Passiflora*.

Os extratos brutos liofilizados das duas espécies de *Passiflora* foram fracionados por partição liquido-liquido com acetato de etila e água, na proporção de 10 g de extrato para 100 ml de cada solvente.

5.3. Estudo morfoanatômico

Os caracteres analisados no estudo da morfologia das drogas vegetais, constituídas de folhas e de caules, foram: filotaxia, forma do limbo, nervação, indumento e pecíolo (tamanho x diâmetro). A terminologia empregada na descrição das formas foliares e padrões de venação seguiu a sugerida por Hickey (1973). A caracterização macroscópica foi efetuada à vista desarmada e com auxílio de lupa esteroscópica Wild Heerbrugg®. A caracterização anatômica das folhas foi realizada em cortes preparados com as drogas vegetais reidratadas e/ou material conservado em etanol 70% (v/v) (BERLYN e MIKSCHE, 1976). Os cortes transversais, os longitudinais radiais e os cortes paradérmicos das folhas, foram efetuados a mão livre, com o auxílio de lâmina de barbear. Os cortes das folhas foram efetuados no terço mediano inferior da lâmina foliar plenamente desenvolvida. Os cortes do pecíolo foram efetuados na porção proximal, mediana e distal à lâmina foliar.

Inicialmente, os cortes histológicos foram diafanizados com solução de hipoclorito de sódio a 50% (v/v). Após lavagem com água destilada, foram tratados com corantes e reativos adequados para cada tipo de estrutura. Na obtenção das preparações semipermanentes os cortes foram corados com soluções de azul de astra e safranina (BUKATSCH, 1972) e montados, entre lâmina e lamínula, em glicerina:água (1:1) (OLIVEIRA et al, 2000).

Na dissociação do material vegetal, empregou-se aquecimento a 60 °C em uma solução contendo volumes iguais de peróxido de hidrogênio a 20% e ácido acético glacial (FRANKLIN, 1945). O material obtido foi corado com uma solução de safranina e azul de Astra (BUKATSCH, 1972).

Os cortes foram observados com auxílio de microscópio Olympus® e as fotos foram obtidas com auxílio de câmera digital Sony ® DSC–P100. As fotos foram tratadas em

microcomputador. Foi utilizado também o microscópio Jenaval – Carl Zeiss®, com polarização cruzada.

5.4. Triagem fitoquímica

A Triagem fitoquímica foi realizada para o EHEL e para as frações. Foram realizados testes para os seguintes grupos de princípios ativos:

a. Cumarinas: visualização em solução alcalina com aparecimento de coloração amarela, e visualização do extrato sob a luz UV (fluorescência azul ou verde) (SIMÕES et al, 2006);

b. Polifenóis: reação com cloreto férrico ($FeCl_3$) (SIMÕES et al, 2006);

c. Flavonóides: cianidina (Shinoda), cloreto de alumínio e hidróxido de sódio (COSTA, 2001);

d. Taninos: acetato de chumbo, proteína (gelatina), alcalóides, reação com $FeCl_3$. (COSTA, 2001; SIMÕES et al, 2006);

e. Saponinas teste de espuma (COSTA, 2001).

f. Alcaloides: reagente de Bertrand (acido silicotungstico a 5%), reagente de Bouchardat (solução aquosa de iodo em iodeto de potássio), reagente de Dragendorff (solução aquosa de acido nítrico 6%, subnitrato de bismuto 8% e iodeto de potássio a 23%) e reagente de Mayer (solução de cloreto férrico a 1,3 % e de iodeto de potássio a 5%) (WAGNER e BLADT, 1996).

5.5. Perfil cromatográfico e isolamento dos compostos majoritários

5.5.1 Cromatografia em Camada Delgada

O perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizado para o EHEL e para as frações com o seguinte sistema:

a. Cromatografia ascendente;
b. Placas de vidro de 20 x 20 cm, recobertas com sílica gel 60_{F254};
c. Saturação total (1 hora), temperatura ambiente;
d. Concentração do extrato de 1 mg/mL;
e. Fases móveis, reveladores e visualização:

e.1. Alcaloides: Fase móvel = Clorofórmio: MeOH : NH_3 10% - (80:40:1,5) (WAGNER e BLADT, 1996) – Revelação: Reagente Dragendorff.

e.2. Flavonoides: Fase móvel 1 = Acetato de etila: H_2O: Acido acético : Acido fórmico (100:26:11:11) e Fase móvel 2 = Tolueno: Formiato de etila: Acido fórmico (50:40:10) – Revelação: revelador NP (ácido difenilbórico 2-amino etiléster) (WAGNER e BLADT, 1996; COSTA, 2001) e visualização ultravioleta a 366 nm (após NP) e revelador anisaldeido sulfúrico seguido de aquecimento a 100º C por 5 minutos (WAGNER e BLADT, 1996).

e.3. Taninos: Fase móvel 1 : alcool terc-butílico: acido acético : H_2O (3:1:1) e Fase móvel 2 : acido acético 6% (STHAL, 1967) – Revelação: $FeCl_3$ 10% em etanol e Ferricianeto de potássio a 50% em etanol (K_3FeCN_6 – solução saturada) – spray – mistura 1:1.

5.5.2 Cromatografia Liquida de Alta Eficiência

Condições analíticas da CLAE (Cromatografia Liquida de Alta Eficiência) com detector de arranjo de diodos (DAD) e Espectrofotômetro de massas Bruker (MS) estão descritas a seguir:

Para os extratos hidroetanólicos brutos liofilizados de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea,* foram empregadas amostras com 1 mg/mL, dissolvidos na fase móvel empregada na CLAE. A fração aquosa também continha 1 mg/mL do extrato bruto liofilizado dissolvido em água e filtrado em membranas de 0,22 µm.

A fração em acetato de etila para as duas espécies vegetais foi levada à secura e redissolvida em 1 mL de fase móvel.

As analises de CLAE/DAD/MS foram realizadas em um equipamento Shimadzu 20A :

Controladora: CBM-20A- Shimadzu

Bombas: LC-20AD Shimadzu

Detector: SPD-20A - Shimadzu

Forno: CTO-20A - Shimadzu

Autoinjetor: SIL 20AC – Shimadzu

A separação foi feita em uma coluna Phenomenex Luna C-18 (250 mm x 4.6 mm – 5 µm), acoplada a uma pré-coluna contendo a mesma fase estacionária. As amostras foram injetadas automaticamente (20,0 µL – contendo 20,0 µg de cada extrato e frações). A coluna e pré-coluna foram termostaticamente controladas a 40° C e um fluxo de 0.8 mL/min foi aplicado, usando um gradiente linear de água com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B), conforme metodologia desenvolvida por Rehwald et al (1994) e validada por Zeraik e Yariwake (2010).

O gradiente otimizado para as amostras de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* foi de:

0-10 min - 12% de B em A,

10-30 min – 20% de B em A.

Os cromatogramas foram obtidos a 330 nm.

Nesta análise por CLAE foi empregado também um detector de massas Bruker - Esquire 3000 Plus - Bruker Daltonics – espectrômetro de massas quadrupole ion trap com as seguintes condições analíticas:

Capilar: 4000 V

Nebulizador: 27 psi

Gás de desolvatação: 7 L/min (Nitrogênio)

Fluxo gás nebulizador: 1 L/hora

Temperatura de secagem: 320º C

Temperatura da fonte: 120º C

Voltagem do cone: 65 V

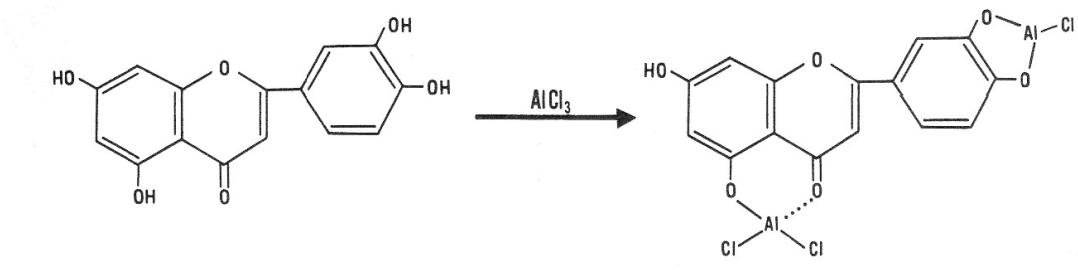
O instrumento foi operado no modo positivo com uso de Electron spray Ionization (ESI – ionização por elétron spray).

Nestas analises foram empregados padrões de orientina (luteolina-8-C-glicosideo – $C_{21}H_{20}O_{11}$) e vitexina (apigenina-8-C-glicosideo – $C_{21}H_{20}O_{10}$) (Fluka – Sigma Aldrich), como auxiliares para identificação dos picos obtidos.

5.6 Quantificação de flavonoides totais

Para a quantificação de flavonoides totais foi empregado o método colorimétrico utilizando o cloreto de alumínio ($AlCl_3$ - Merck) como agente complexante. Sabemos da literatura (MARCUCCI et al, 1998), que o íon Al^{3+} se complexa com os oxigênios vicinais presentes nos flavonoides, ocorrendo um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda (deslocamento batocrômico), possibilitando a quantificação dos mesmos. Outros compostos fenólicos, que comumente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais, mesmo formando complexos com cloreto de alumínio ($AlCl_3$) absorvem em comprimentos de onda inferiores, minimizando interferências nas medidas de absorbância (MARCUCCI et al., 1998, MARKHAM, 1982). A figura 6 representa os três sítios quelantes possíveis presentes nos flavonoides: grupos 3-OH, 5-OH e 3'-4'-O-diOH.

Figura 6: Reação de complexação de flavonoide com cloreto de alumínio. (MABRY et al, 1970).



A metodologia utilizada foi adaptada da Farmacopeia Francesa (POZZI, 2007). A quantificação foi realizada em placas de 96 poços (Microplate flat – Cralplast – cod: 655111) e as absorbâncias determinadas, após 30 minutos da adição do agente complexante (solução de $AlCl_3$ a 2% em etanol 60%), em espectrofotômetro Spectra Max 190 – Molecular Devices® em um comprimento de onda de 430 nm. As amostras foram analisadas em triplicatas.

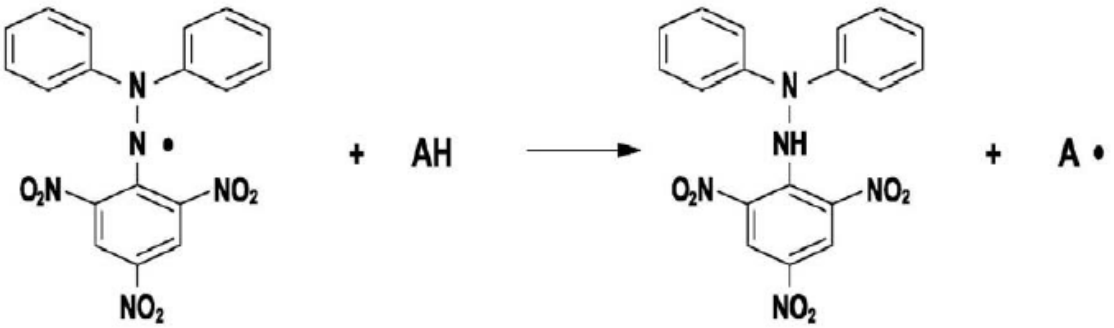
Para a execução da técnica utilizou-se vitexina em etanol 60% como padrão externo. A construção da curva de calibração foi preparada a partir da solução de vitexina (Fluka – Sigma Aldrich) de concentração de 1 mg/mL que foi diluída nas seguintes concentrações: 150 µg/mL, 100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL, 37,5 µg/mL e 25 µg/mL. Em seguida, adicionou-se a cada 2,0 mL das diluições do padrão mais 2,0 mL de uma solução de $AlCl_3$ 2% em etanol. Etanol 60 % foi utilizado como branco. A concentração de flavonoides foi calculada de acordo com a equação da reta, obtida da curva de calibração. A quantificação de flavonoides foi realizada para o extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de *Passiflora edulis e de Passiflora setacea*. Foram preparadas soluções em etanol 60 % com concentração de 5 mg/mL para as três frações. Os valores foram expressos como média seguida dos seus respectivos erros padrão.

5.7 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi medida pelo teste de DPPH• (2,2'-difenil-1-picril-hidrazila – Sigma-Aldrich) radicalar, segundo o método de Brand-Williams (BROINIZI et al, 2007; SILVA F. et al, 1999). DPPH• é caracterizado como um radical estável devido à deslocalização do par de elétrons na molécula. Isto faz com que a molécula não sofra dimerização, como acontece com outros radicais livres. Esta deslocalização do par de elétrons livres produz cor violeta caracterizada por absorver em 517 nm. Quando a solução de DPPH• é misturada com uma substancia que pode doar um átomo de hidrogênio (figura 7), a forma reduzida é formada, o que é acompanhado pela perda da coloração violeta.

Dessa maneira, o teste mede a capacidade de uma substância potencialmente antioxidante de sequestrar radicais livres.

Figura 7: Reação de DPPH• (radicalar) com um antioxidante (PISOSCHI et al, 2009).



DPPH• (radicalar)

Cor violácea

DPPH (reduzido)

Cor amarela

O Trolox© (acido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromane-2-carboxilico – Sigma-Aldrich) foi empregado como substancia referência, por ser um derivado hidrossolúvel da vitamina E, com forte poder antioxidante (sequestrador de radicais livres). A CE_{50} (concentração efetiva para causar 50 % de decaimento da cor violácea) foi calculada a partir da regressão linear da curva dose/resposta. Para a curva de calibração o Trolox® foi empregado nas concentrações finais de 15, 20, 30, 40 e 50 µg/mL.

Em placas com 96 poços (Microplate flat – Cralplast – cod: 655111) foram adicionados 50 µL das amostras a serem testadas das duas Passifloras (extrato bruto (EHEL) e fração aquosa – concentração de 5 mg/mL cada) e do Trolox© diluídos em metanol 80%. Nas amostras e na referência foram acrescentados 150 µL de DPPH• radical na concentração de 0,06 mM. A solubilização do DPPH• radical foi feita primeiro em metanol puro e após a completa solubilização, agua foi adicionada para obter a proporção de metanol 80%. A amostra controle foi obtida com 50 µL de metanol 80% e 150 µL da solução de DPPH• radical e para o branco foram utilizados 200 µL de metanol 80%. Após duas horas de reação no escuro a absorbância foi determinada a 517 nm em espectrofotômetro Spectra Max 190 – Molecular Devices® . As amostras foram processadas em triplicata.

O calculo da redução percentual do DPPH• radical foi efetuado da seguinte forma:

% redução DPPH• = $[(Abs_{cont} – Abs_{am}) / Abs_{cont}] X 100$

Onde:

Abs_{cont} = absorbância controle

Abs_{am} = absorbância amostra e ou Trolox®

5.8 Endotoxinas

O ensaio de endotoxinas foi realizado pelo laboratório CONFAR® (Laboratório de Controle de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários, Produtos afins a as Respectivas Matérias-Primas), sob responsabilidade da prof. Dra. Terezinha de Jesus Pinto, nos extratos brutos liofilizados (EHEL) de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*.

O teste realizado foi o LAL (Limulus amebocyte lysate) utilizando o kit Lonza® 50-650U (LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE, LONZA, 2013), com detecção de endotoxinas de bactérias gram-negativas. As amostras são misturadas com o reagente LAL, colocadas em placas e incubadas, sendo determinado o tempo necessário para produzir uma coloração amarela. A presença de grande quantidade de endotoxinas faz com que a reação seja rápida, ou seja, o tempo de reação é inversamente proporcional à quantidade de endotoxinas presentes. A concentração de endotoxinas em amostras desconhecidas pode ser calculada através do uso de curvas padrão.

5.9 Ensaios biológicos

Os ensaios de cicatrização foram realizados nas instalações da Universidade Cruzeiro do Sul, sob a coordenação da Profa. Dra. Elaine Hatanaka, e aprovados pelo comitê de ética da referida instituição com o protocolo CE/UCS-022/2013 de 14 de maio de 2013 e ratificados pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP. Todos os experimentos com animais foram realizados durante a fase clara, uma vez que a acrofase da inflamação ocorre neste momento, devido à liberação de melatonina na fase escura (LOPES et al, 1997).

As amostras dos extratos hidroetanólicos liofilizados (EHEL) das espécies vegetais foram dissolvidas em tampão isotônico fostato-salino PBS pH = 7,4 (phosphate buffered saline) estéril e filtradas em membrana Millipore® 0,22 µm.

5.9.1 Cultura celular

Com intuito de diminuir o número de animais empregados neste estudo, neutrófilos foram obtidos por separação do sangue de três voluntários adultos saudáveis do sexo masculino, em três dias diferentes. O sangue tratado foi centrifugado por 10 min. a 4º C em 500 G. As condições de incubação dos neutrófilos foram: meio de cultura RPMI – 1640® (Cultilab®) com 10% de SBF (soro bovino fetal), (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), adição de 10^4 células por poço em placas de cultura (Tissue culture testplate 96F – TPP 92096), incubação a 37º C e 5% de CO_2. O número de células viáveis foi determinado por contagem em câmara de Neubauer por exclusão de trypan blue em microscópio óptico. Os tratamentos foram preparados dissolvendo os extratos hidroetanólicos liofilizados (EHEL) de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* em PBS a uma concentração de 1 mg/mL, e filtrados com membrana de 0,22 µm. Como controle foram usadas células não tratadas. Todas as análises foram feitas em duplicatas para cada um dos três voluntários.

Os neutrófilos foram transferidos para placas de cultura de 96 poços na concentração de 10^4 células por poço (densidade de células = 3 x 10^5 cel/mL), e foi adicionada cada uma das amostras de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* em uma das concentrações finais de 0,1 mg/mL, 1 mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL. Esses 5 grupos (controle e fração aquosa nas 4 concentrações para cada espécie vegetal) também foram testados com a adição concomitante de um estimulo positivo de LPS (5 µg/mL) para a verificação da produção de citocinas. Após o tempo de incubação de 4 horas as placas de cultura foram centrifugadas a 500 G por 5 min a 4º C. O sobrenadante foi guardado a -80º C para doseamento das citocinas: IL-8, TNF- α e IL-1β por ELISA (DuoSet kit; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e o precipitado (pellet) foi usado para as análises de integridade de membrana e fragmentação de ADN com o uso do citômetro de fluxo (Citômetro BD, ACCURI C6).

5.9.1.1 Ensaio de Integridade de membrana

As placas de cultura foram incubadas conforme descrito acima e o pellet foi ressuspendido em 150 µL de PBS e 50 µL de iodeto de propídio (1 mg de IP/10 mL em PBS) e analisadas por citometria de fluxo (Citômetro BD, ACCURI C6). A citometria de fluxo é uma

técnica utilizada para se determinar diferentes parâmetros celulares. Os citômetros de fluxo são equipamentos que possuem quatro sistemas inter-relacionados:

- o primeiro é um sistema fluídico que transporta as partículas da amostra através de uma câmara,
- o segundo é um sistema de iluminação, utilizado para analise da partícula,
- o terceiro é um sistema ótico e eletrônico para direcionamento, armazenamento e tradução dos sinais de desvio de luz de emissão de fluorescência que resultam da iluminação das partículas,
- e o quarto sistema é o controle computacional que interpreta os sinais elétricos e os transforma em dados significativos para posterior análise. (JAROSZESKI e RADCLIFF, 1999).

O sistema ótico e eletrônico do citômetro possui um raio laser que após interceptar uma única célula ou partícula desvia e emite a luz em todas as direções (360º). A luz desviada na mesma direção do raio laser resulta da difração (FSC – *forward angle light scatter* – luz desviada para frente) e fornece informações morfológicas básicas como tamanho celular relativo. A luz desviada a 90º em relação ao raio incidente é o resultado da refração e reflexão (SSC – *side angle light scatter*). Este parâmetro é um indicador de granulosidade do citoplasma das células, assim como de irregularidades da superfície da membrana.

A fluorescência ocorre quando partículas ou células marcadas com fluorocromos são iluminadas pelo raio laser e emitem luz com uma composição espectral específica. Isto fornece informações bioquímicas, biofísicas e moleculares sobre o constituinte celular ao qual a sonda está ligada. A fluorescência é detectada simultaneamente com FSC e SSC. (SHAPIRO, 1995 e BOECK, 2001).

Gráficos de pontos (*dot plots*) que apresentam os dois tipos de desvio da luz (FSC e SSC) podem fornecer informações morfológicas importantes, como tamanho da célula e granulosidade. Também podem ser usados para identificar células viáveis e restos celulares (células mortas).

O iodeto de propídio (IP) é um composto fluorescente altamente solúvel em água que se liga às cadeias do ADN, mas não penetra em membranas celulares integras. A fluorescência em todos os experimentos foi medida usando o canal FL2 (laranja – λ= 560-580 nm). Dez mil

eventos foram adquiridos por experimento. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o BD Accuri C6 *Software*.

5.9.1.2 Ensaio de fragmentação de ADN

As células foram incubadas e centrifugadas como descrito acima. O pellet foi ressuspendido em 450 µL de solução hipotônica (0,1% citrato de sódio, e 0,1% Triton-X-100®) e 50 µL de iodeto de propídio (1 mg IP/10 mL em PBS), e então incubado por 30 min. Esse detergente (Triton®) permeabiliza as membranas celulares permitindo a entrada do fluorocromo (IP) que se incorpora a fragmentos de ADN. Quando o ADN não sofreu degradação o IP se intercala entre as duplas fitas dos ácidos nucleicos, caso contrário ocorre uma menor incorporação. Assim quanto maior a fragmentação menor a fluorescência.

A apoptose, ou morte celular programada, é de grande interesse e foi definida originalmente como fragmentação do ADN devido à ativação de endonucleases em um processo complexo. Não somente atividades enzimáticas, mas também alterações na composição da membrana celular, mitocôndria, múltiplas funções celulares e alterações morfológicas são detectáveis por citometria de fluxo. Alterações morfológicas de núcleos apoptóticos podem ser visualizadas por mudanças nos sinais de desvio de luz, e a fragmentação do ADN pode ser medida por qualquer corante de ADN, sendo o IP o mais comum. Perda de ADN resulta em núcleos com intensidade de fluorescência reduzida em comparação com a intensidade do núcleo integro (SHAPIRO, 1995 e BOECK, 2001).

A leitura e análise também foram realizadas como descrito acima.

5.9.2 Ensaio de ferida no dorso de ratos

O ensaio de cicatrização foi realizado com 30 ratos Wistar machos (nascimento: 15/09/2013 – recebidos: 04/11/2013 – inicio experimento: 11/11/2013 – peso: 178-182 g – 58 dias de vida), oriundos do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, separados aleatoriamente em 3 grupos de 10 animais: - controle (gel de carbopol® ETD 2020); - fração aquosa do extrato EHEL das duas espécies incorporados em gel de carbopol® ETD 2020 (extrato incorporado a 1%). Todos os animais receberam água e ração da marca Purina® *ad libitum* e foram acondicionados em caixas de polietileno em condições de umidade e temperatura

ambientais (46-50%, 22°C), com fase de claro e escuro de 12 horas cada (GARROS et al, 2006). Cada animal foi mantido em caixas individuais.

Os animais foram anestesiados por xilazina (20 $mg.mL^{-1}$) e quetamina (50 $mg.mL^{-1}$) e então tiveram o dorso tricotomizado seguido de limpeza com etanol 70% (LIMA et al, 2006). Uma ferida foi então aberta, até a fáscia muscular, com uma tesoura cirúrgica e um modelo de área guia de 1 cm^2, criando uma ferida de 1 cm^2 (GARROS et al, 2006; LIMA et al, 2006). Após a cirurgia os animais receberam topicamente 1 mL de um dos três tratamentos 1 vez ao dia (GARROS et al, 2006), por 15 dias ou até o fechamento total da ferida, permanecendo em gaiolas individuais (LIMA et al, 2006). O tamanho dos ferimentos foi medido no tempo inicial, nos primeiros 3 dias (24, 48 e 72 horas) e então a cada 2 dias por meio de fotografia digital (D3000 – Nikon) a uma distância padronizada de 60 cm e análise digital pelo software ImageJ 1.6.0 que permite calcular a área das feridas.

5.9.3 Ensaio de migração de neutrófilos em bolsa de ar estéril

O efeito da fração aquosa dos extratos EHEL das duas plantas, dissolvidos em PBS estéril, sobre a migração de neutrófilos *in vivo* foi avaliado através da indução de bolsa de ar estéril no tecido subcutâneo do dorso de ratos, separados em 6 grupos. Sete dias após a administração de 20 mL de ar esterilizado através de filtro com diâmetro menor que 0,22 µm as bolsas foram novamente insufladas com 10 mL de ar estéril e foram adicionados os seguintes tratamentos:

- 1 mL de PBS para controle negativo,
- 1 mL de extrato EHEL de *Passiflora edulis* dissolvido em PBS estéril a 1%,
- 1 mL de extrato EHEL de *Passiflora setacea* dissolvido em PBS estéril a 1%,
- 1 mL de PBS estéril contendo o estímulo positivo LPS (controle positivo – 5 µg de LPS/mL).
- 1 mL de extrato EHEL de *Passiflora edulis* (1%) dissolvido em PBS estéril mais o LPS (5 µg/mL).

- 1 mL de extrato EHEL de *Passiflora setacea* (1%) dissolvido em PBS estéril mais o LPS (5 µg/mL).

Quatro horas após as injeções dos estímulos, os animais foram eutanasiados e o exsudado inflamatório foi coletado por lavagem da cavidade formada com 2 mL de PBS. A suspensão foi centrifugada a 400 G por 10 min. a 4°C. O sobrenadante foi separado para posterior análise de citocinas e as células foram ressuspendidas em 1 mL de PBS, tendo seu número contado no citômetro de fluxo. O sobrenadante foi congelado para a dosagem de citocinas pelo método de ELISA (DuoSet kit; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) para as seguintes citocinas, TNF-α, CINC-2α/β, MIP, IL-6 e IL-1-β (TAMURA et al, 2009).

5.10 Análise estatística

Todos os resultados foram comparados usando ANOVA, seguido do teste de ajuste de p utilizando o método de Bonferroni. Resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0.05$.

Resultados

6. Resultados

6.1 Descrição macroscópica – *Passiflora edulis* Sims

As folhas de *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae, (Figura 8-a) são simples, alternas, trilobadas ou com menor frequência, inteiras ou bilobadas, de base cordada, ápice acuminado e margem serrilhada. Adicionalmente, nos bordos encontram-se glândulas oval-elípticas. As folhas apresentam as três nervações mais desenvolvidas partindo da região basal da lâmina. O tamanho da folha varia de 7 a 12 cm de comprimento por 11 a 13 cm de largura. A folha desidratada, de aspecto amarrotado, coloração acastanhada, consistência subcoriácea, apresenta superfície lisa e glabra. O pecíolo, de 2 a 3 cm de comprimento, cerca de 1 mm de diâmetro, mostra-se torcido próximo ao caule e provido de um par de nectários côncavos localizados próximos à região basal da lâmina foliar. O caule em estrutura secundária (Figura 8-b) apresenta estrias finas dispostas longitudinalmente. Estípulas triangular-subuladas são evidentes. Gavinhas (Figura 8-b) são observadas na região da inserção das folhas. Difere de *Passiflora alata,* pois esta apresenta folha inteira, margem lisa, nervação peninérvia e é desprovida de tricomas tectores na região da nervura principal. (FB 5 ed, 2010, BERALDO e KATO, 2010).

Figura 8. *Passiflora edulis* Sims – A = folha (face adaxial) e B = caules com folhas e gavinhas (planta seca) - Foto: A - https://www.google.com.br/search?q=fotos+folhas+passiflora+edulis&tbm**,** B - A. R. Almeida.

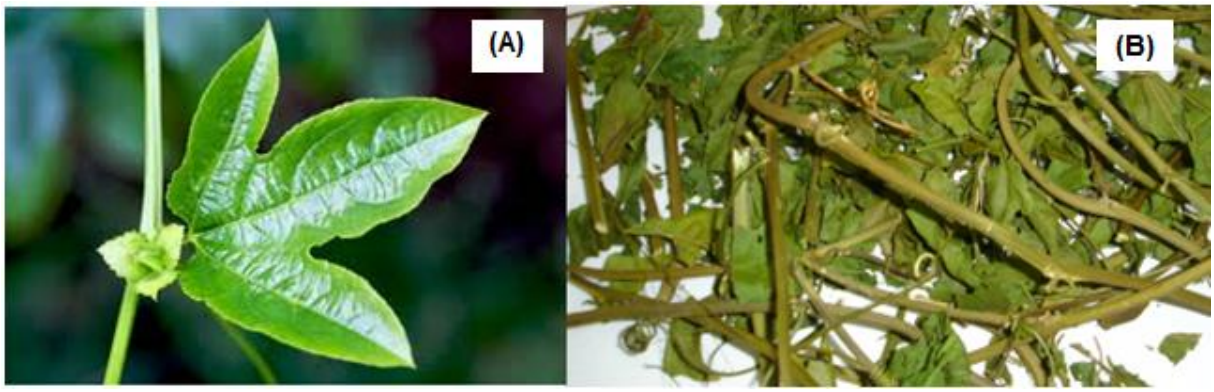


Figura 9 . *Passiflora edulis* conforme recebida – folhas, caules e gavinhas (planta seca) - Foto: A. R. Almeida

6.2 Descrição macroscópica – *Passiflora setacea* DC

Passiflora setacea é uma das espécies nativas encontradas nos biomas Cerrado e Caatinga (OLIVEIRA e RUGGIERO, 2005).

De acordo com a descrição botânica da espécie, *Passiflora setacea* apresenta caule cilíndrico tomentoso com tricomas suaves e macios. Estípulas setáceas, de 5 mm, decíduas**.** Pecíolos de 3 cm, próximos à base foliar, com um par de glândulas sésseis, medindo cerca de 1 mm de largura. Folhas de 5-8 × 6-10 cm, trilobadas (lóbulos oblongos ou oblongo-lanceolados), serreadas nos bordos, cordadas na base, trinervadas, membranáceas a subcoriáceas, normalmente pilosas em ambas as superfícies; tricomas macios ao tato; raramente glabras em uma das superfícies. Pedúnculos de 8-10 cm, robustos, articulados perto do ápice, tomentosos. Brácteas em número de três, verticiladas, situadas cerca de 1 cm da base floral, oblongo-lanceoladas, acuminadas no ápice, estreitando-se na base; bordo serreado ou da metade para o ápice. Há a presença de gavinhas na região da inserção das folhas (CERVI, 1997).

Figura 10 . *Passiflora setacea* - planta fresca – A, B e C – vista desarmada da planta fresca com folhas, inicio de flores e gavinhas. Foto: A. R. Almeida

Figura 11 . ***Passiflora setacea*** **– Folha - vista desarmada da face adaxial: glabra (A,B) com tricomas tectores no peciolo (C) e borda serrilhada (D). Fotos B,C e D – Uso de lupa esteroscópica Wild Heerbrugg® -** Foto: A. R. Almeida

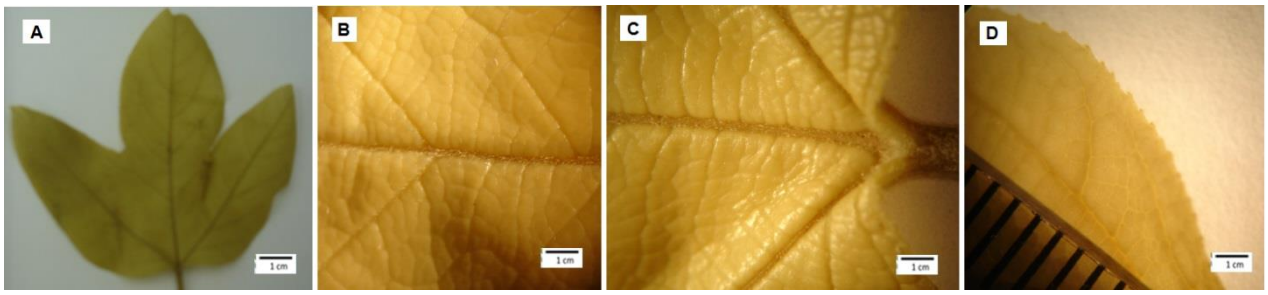


Figura 12 . ***Passiflora setacea*** **– Folha - vista desarmada da face abaxial: vários tricomas tectores em toda a extensão da folha e no pecíolo (A,B,C) e borda serrilhada (D). Fotos B,C e D – Uso de lupa esteroscópica Wild Heerbrugg® -** Foto: A. R. Almeida

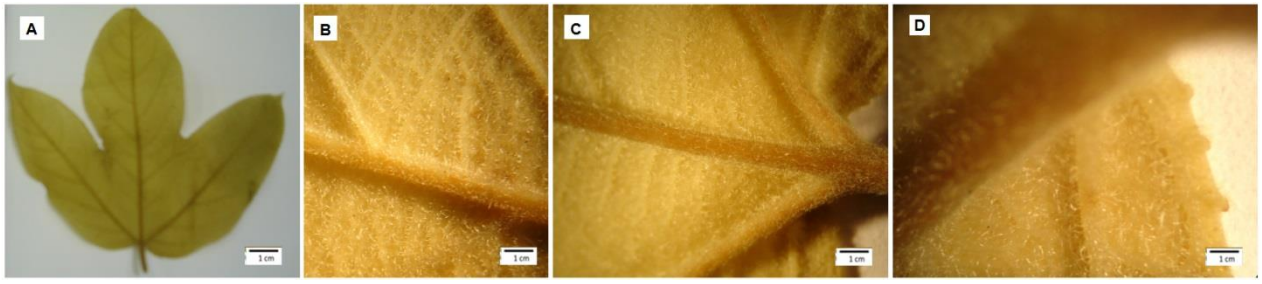


Figura 13 . ***Passiflora setacea*** **– peciolo e nectários (A, B e C – vista dos pecíolos e nectários em lupa esteroscópica Wild Heerbrugg®)** Foto: A. R. Almeida

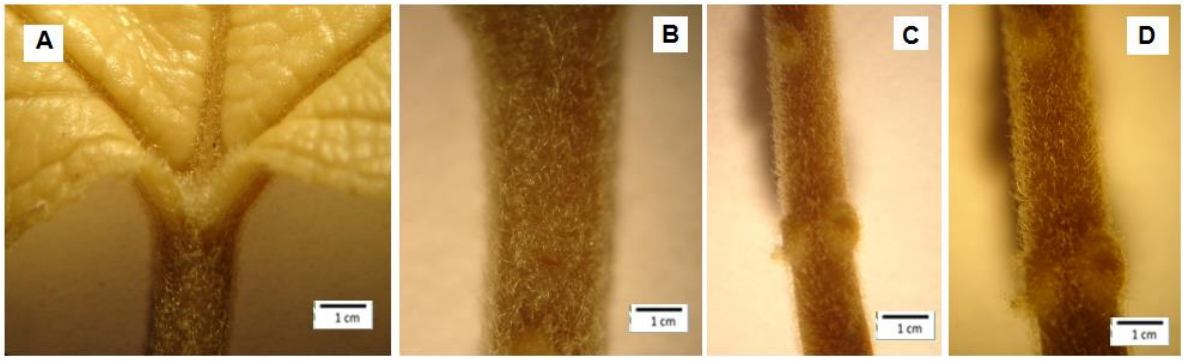
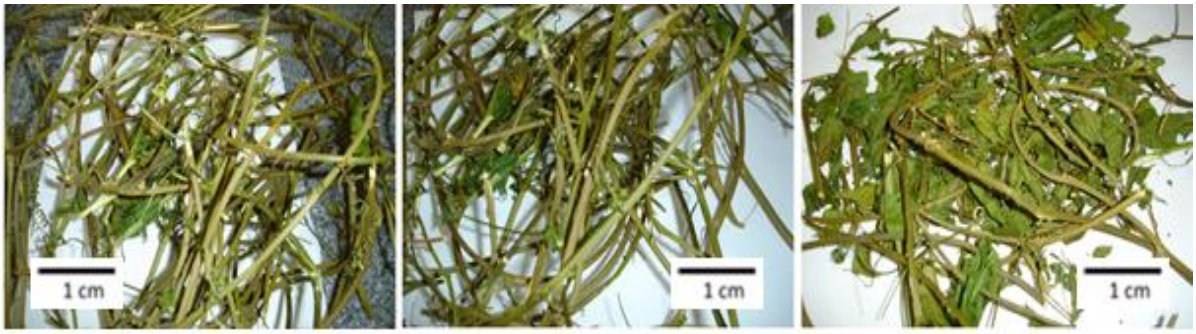


Figura 14 . ***Passiflora setacea – conforme recebida (planta seca – folhas e caules)*** Foto: A. R. Almeida



6.3. Descrição microscópica – *Passiflora edulis* Sims

A descrição microscópica das folhas, pecíolos e caules de *Passiflora edulis* pode ser encontrada no trabalho de Beraldo e Kato, 2010.

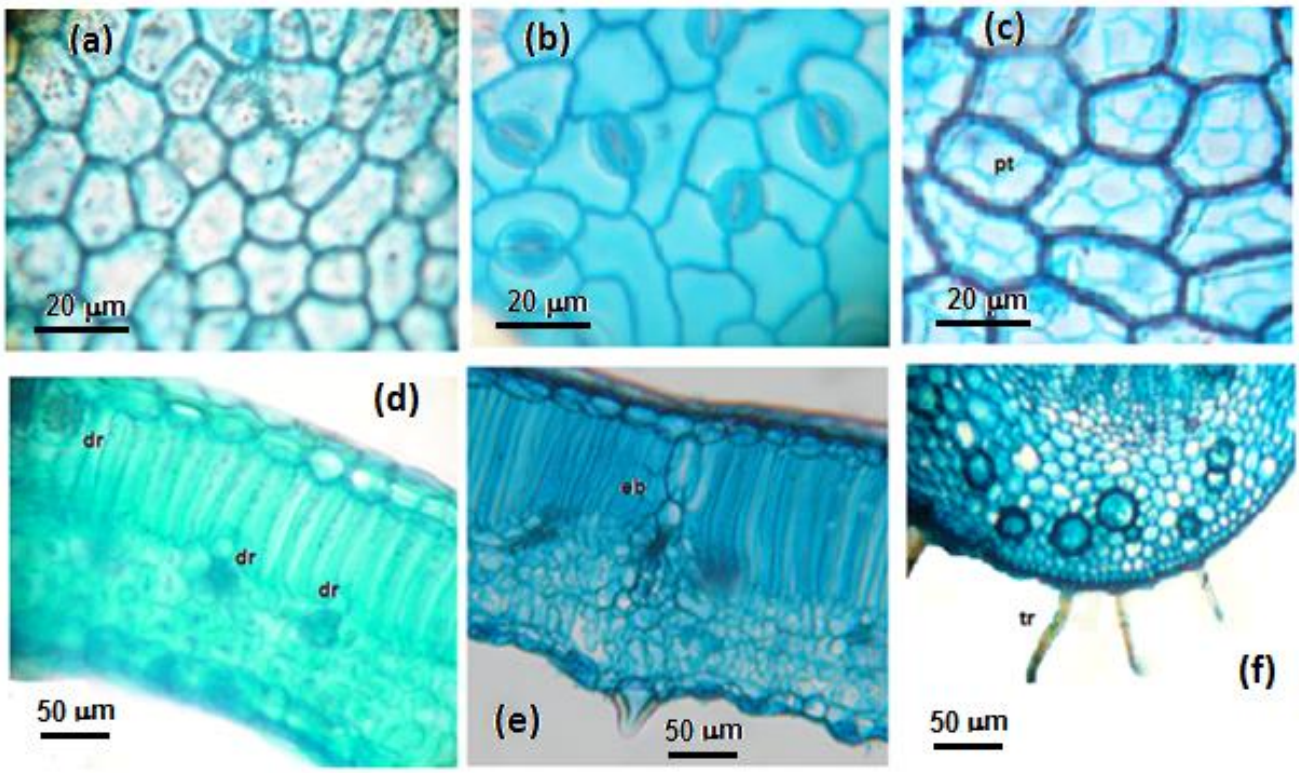
6.4. Descrição microscópica – *Passiflora setacea* DC

6.4.1 – Folha:

Em vista frontal, a face adaxial, recoberta por cutícula lisa, com células epidérmicas uniestratificadas e alongadas no sentido tangencial (periclinal), com formatos variáveis (quadrangulares, arredondadas, triangulares (Figura 15-a). A face adaxial apresenta campos primários de pontuação (Figura 15-c). Epiderme da face abaxial com células de formato semelhante, porem menores. Estas células epidérmicas apresentam paredes finas e com estômatos ladeados por 3 a 4 células, predominando os estômatos anomocíticos. (Figura 15-b).

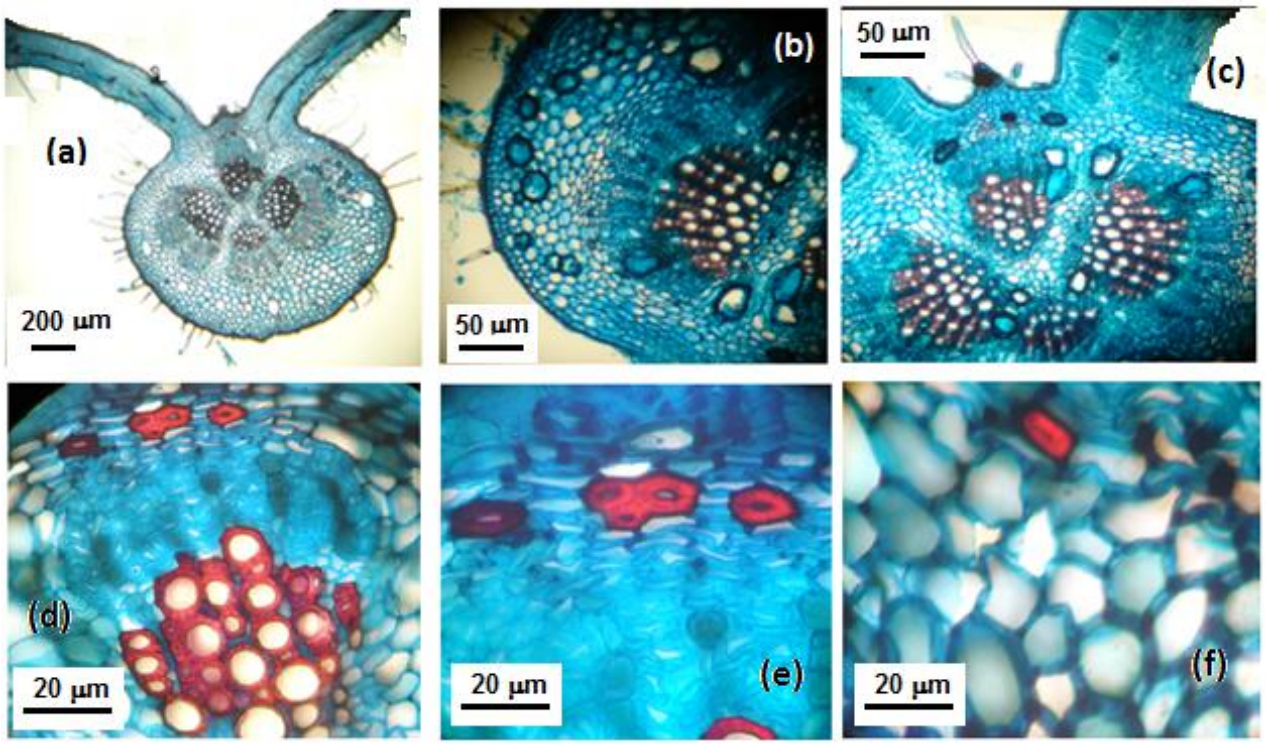
Tricomas tectores uni e pluricelulares, unisseriados, estão presentes em grande número na face abaxial. (Figura 15-f). Vários estômatos no mesmo nível das demais células epidérmicas (de átrio externo), podem ser observados na face abaxial da folha hipoestomática. (Figura 15-e). Mesofilo dorsiventral com parênquima paliçádico, composto por uma camada de células, que ocupa mais da metade da estrutura do mesofilo. Parênquima esponjoso presente, com 5 a 7 camadas de células, com pequenos espaços (meatos). (Figura 15-d e 15-e). Presença de muitas drusas na região dos parênquimas. (Figura 15-d). Feixes colaterais abertos são encontrados em regiões repetidas da folha, com presença de extensões de bainha. (Figura 15-e).

Figura 15. ***Passiflora setacea*** **– Folha - (a) – vista frontal da face adaxial, (b) - vista frontal da face abaxial, com estômatos anomocíticos (c) – vista frontal da epiderme foliar, face adaxial, evidenciando os campos primários de pontuação (pt), (d) –secção transversal da folha mostrando mesofilo dorsiventral com drusas (dr), (e) – secção transversal da folha com mesofilo com extensões de bainha (eb), (f) – tricomas (tr) tectores da face abaxial da folha. Coloração: Azul de astra.** Foto: A. R. Almeida



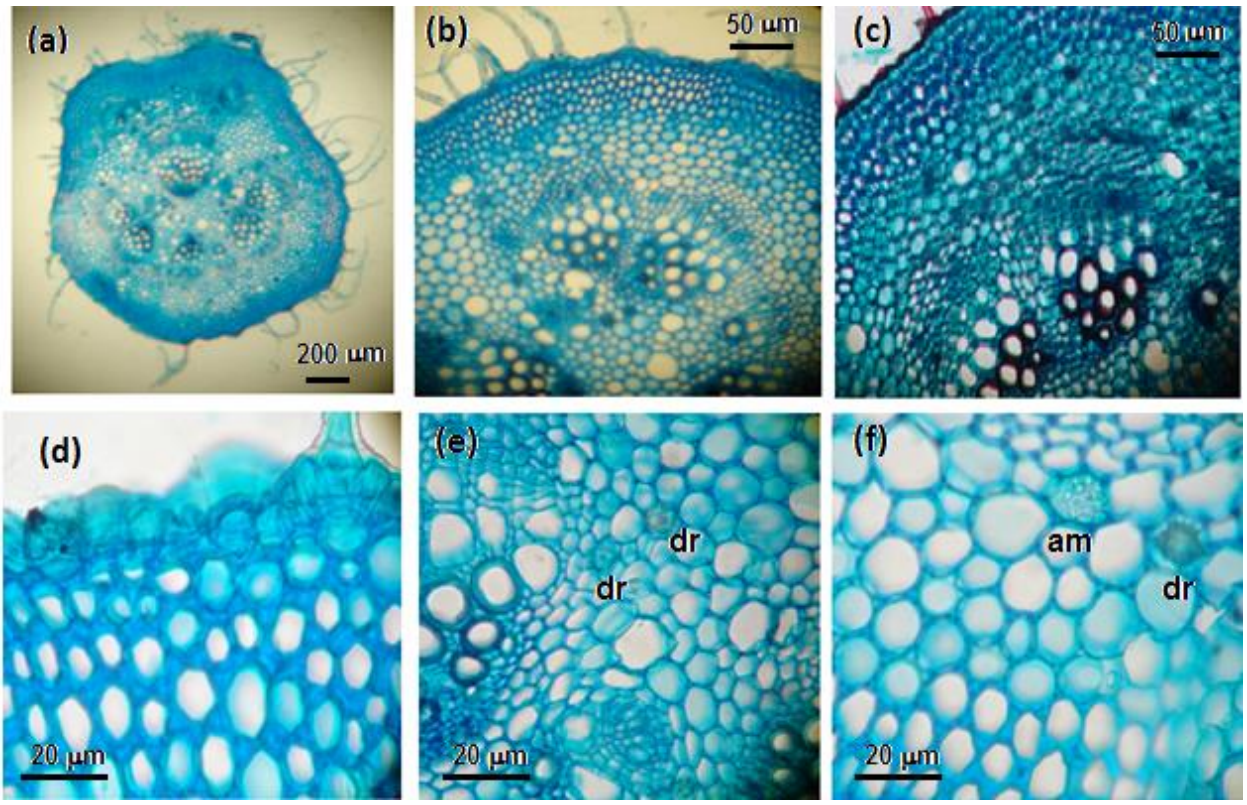
A nervura mediana tem contorno biconvexo, com epiderme com células menores que as observadas no resto da folha (Figura 16-a). A cutícula, na região da nervura forma cunhas. O parênquima paliçádico não penetra na nervura. (Figuras 16-c). Presença de colênquima do tipo lacunar e angular, com predominância do tipo angular (Figura 16-b). Na região abaxial, observam-se 3-5 camadas de células de colênquima, também do tipo angular. Grande número de tricomas tectores, uni e pluricelulares e unisseriados, são encontrados na região abaxial da nervura (Figura 16-a). O sistema vascular, do tipo colateral aberto, está disposto de forma ordenada, com 4-5 feixes vasculares dispostos em círculos. (Figura 16-a e 16-c). Presença de varias drusas (Figura 16-c). Raras fibras perivasculares, solitárias ou em grupos de 2 ou 3 fibras, próximas aos feixes vasculares, e no parênquima central. (Figuras 16-d, 16-e, 16-f).

Figura 16 - *Passiflora setacea* - Folha: secção transversal da folha evidenciando a nervura central - (a) – visão da nervura central, (b) – região abaxial da nervura, com tricomas tectores, cutícula e colênquima, (c) – feixes vasculares colaterais abertos, (d) – feixes vasculares e fibras perivasculares, (e) e (f) – fibras perivasculares (isoladas ou em grupos de 2-3). Coloração: Azul de astra e safranina. Foto: A. R. Almeida



O pecíolo possui epiderme com uma única camada de células seguida por 6 a 10 camadas de células colenquimáticas com espessamento predominantemente angular (Figura 17-c e 17-d). O parênquima cortical é formado por 5 a 6 camadas de células arredondadas com meatos. O sistema vascular encontra-se disposto em 2 conjuntos: um formado por 6 a 7 feixes dispostos de forma circular e outro grupo com 2 feixes localizados nos pequenos lobos do pecíolo. Tricomas tectores uni e pluricelulares e unisseriados são encontrados em toda a extensão do pecíolo (Figura 17-a e 17-b). Varias drusas são encontradas no parênquima cortical e próximas aos feixes (Figura 17-d), assim como vários amiloplastos (Figura 17-f).

Figura 17 - *Passiflora setacea* – secção transversal do peciolo: (a) visão do pecíolo, (b), (c) e (e) – cutícula, colênquima, feixes vasculares e tricomas tectores, (d) drusas (dr) no parênquima cortical, (f) – amiloplastos (am). Coloração: Azul de astra e safranina. Foto: A. R. Almeida



6.4.2 - Caule:

Na secção transversal do caule de *Passiflora setacea,* foi observado o formato predominantemente ovalado, diferindo do caule de *Passiflora edulis* (Figura 18-a). Tricomas tectores uni e pluricelulares, unisseriados, percorrem todo o caule. Epiderme com uma camada de células, envolvida por cutícula espessa e lisa. Na sequencia, observa-se o colênquima, predominantemente angular, com 5-6 camadas de células (Figura 18-b). Presença de vários amiloplastos (Figura 18-f). Feixes vasculares (10 a 12 unidades) dispostos em círculo, de forma ordenada. Estes feixes são do tipo colateral aberto (Figuras 18-a e 18-d). Os raios xilemáticos estão dispostos em fileiras radiais, nos feixes vasculares de maior porte (Figura 18-d). Presença de varias drusas tanto no parênquima cortical quanto nos raios xilemáticos. (Figura 18-e)

Figura 18. ***Passiflora setacea*** **– secção transversal do caule (a) – visão do caule e dos feixes vasculares, (b) – cutícula, epiderme, colênquima e tricomas tectores, (c e d) – feixes vasculares colaterais abertos, (d) – drusas (dr) no floema, (f) – amiloplastos (am) no parênquima cortical. Coloração: Azul de astra e safranina.** Foto: A. R. Almeida

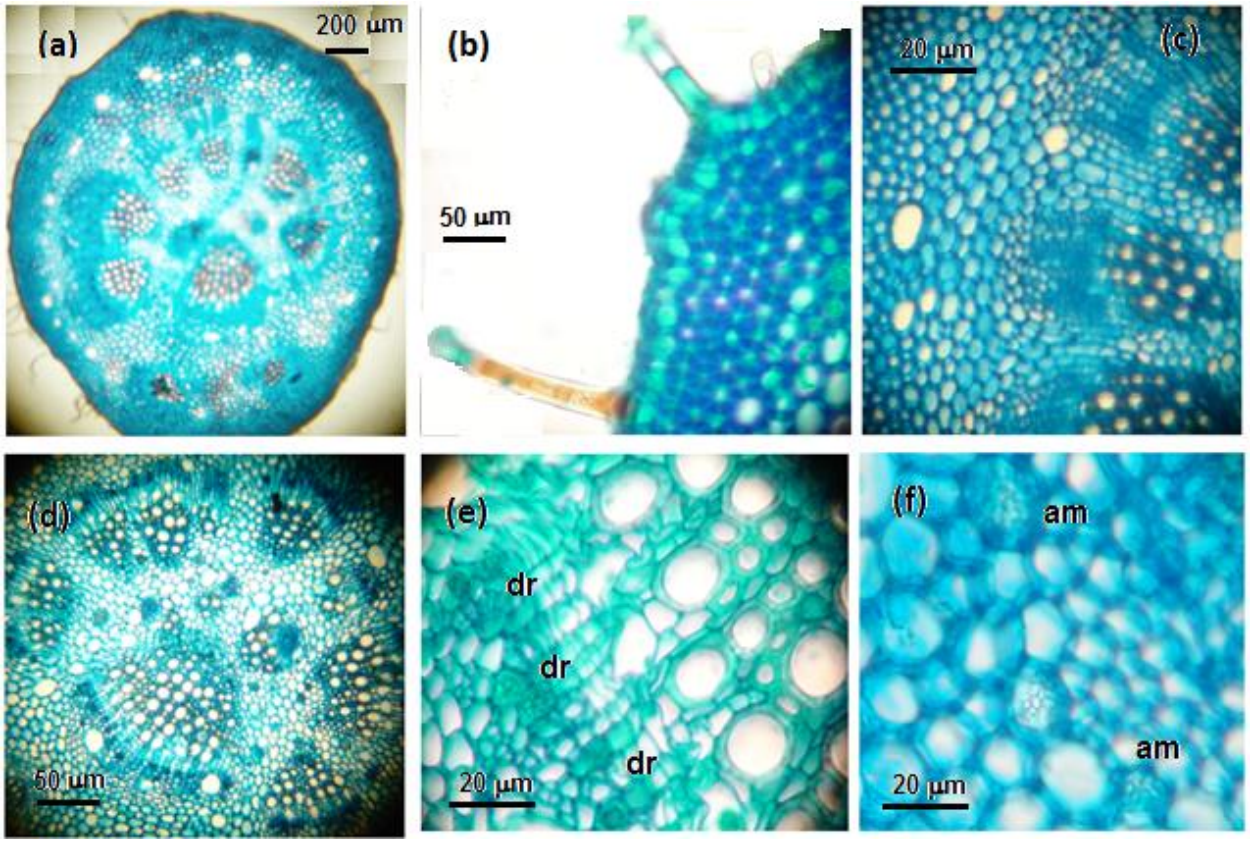
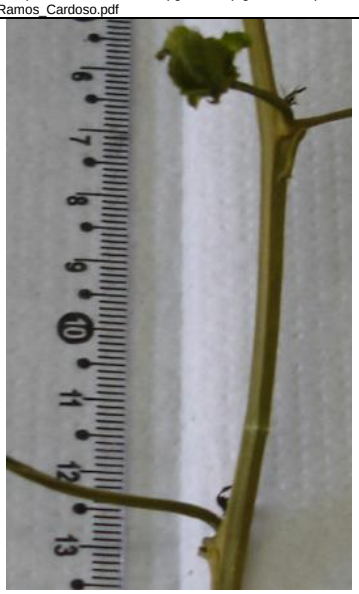


Tabela 1 – Diferenças macroscópicas e microscópicas principais entre *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*:

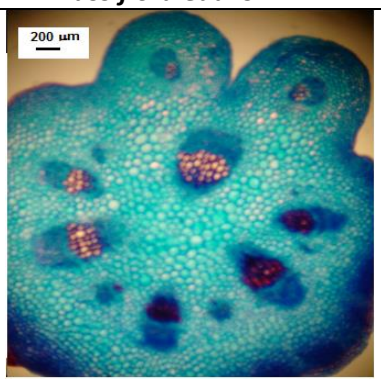
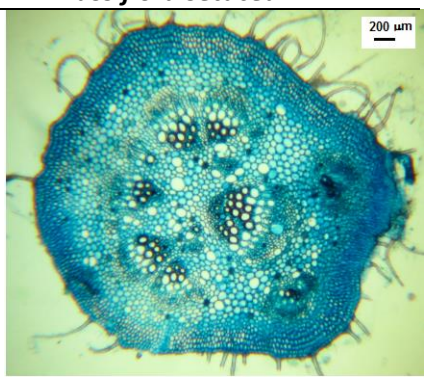
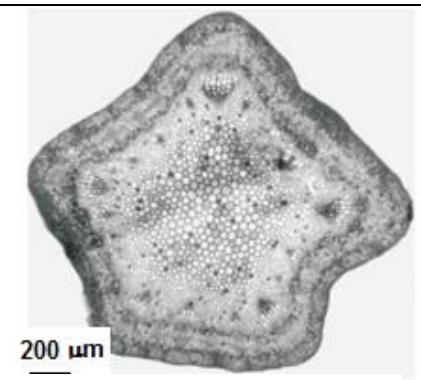
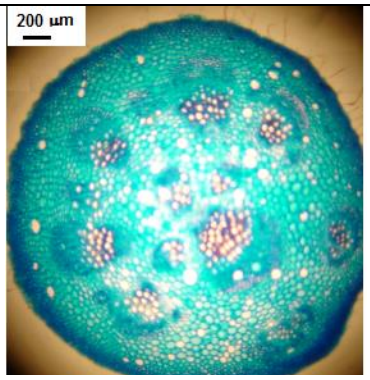
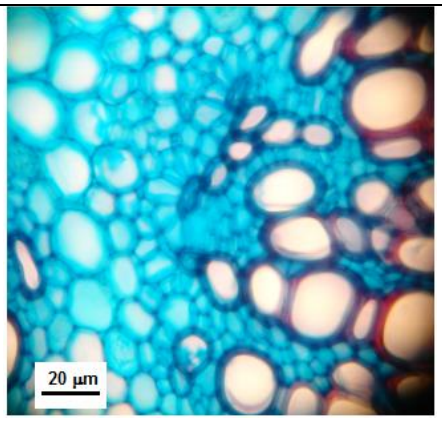
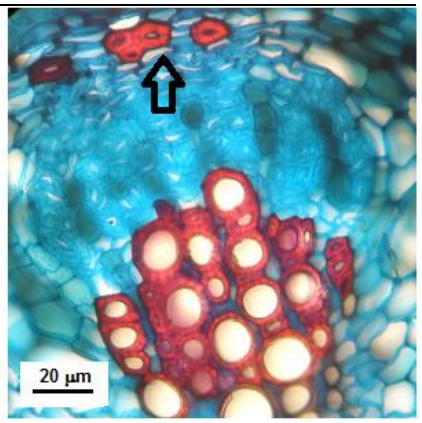
Diferenças macroscópicas

	***Passiflora edulis* Sims**	***Passiflora setacea* DC**
Folhas e flores	 Flores axilares de 5-7,5 cm de diâmetro. Tubo do cálice campanulado, com dez nervuras proeminentes. Sépalas oblongas de 2-3,3 cm × 7-10 mm; uma arista foliácea na parte dorsal, de 3-6 mm; cor verde, na face abaxial, e branca na face adaxial. Pétalas oblongas, de 1,8-2,9 cm × 5-8 mm, obtusas, alvas. Corona de filamentos em 4-5 séries. No interior do tubo do cálice, entre a corona de filamentos e o opérculo, pequenos processos dentiformes de cor avermelhada. (CERVI, 1997) http://odandy.blogspot.com.br/2007/04/passiflora-edulis.html	 Flores com cerca de 10 cm de diâmetro. Tubo do cálice cilíndrico campanulado, de 1,5 cm. Sépalas oblongas, de 3,5-4 cm × 5-7 mm, obtusas no ápice, margem verde e centro branco, carenadas. Pétalas linear oblongas, de 2-2,5 cm × 5-6 mm, alvas. Corona de filamentos em uma única série, de 1 cm de comprimento; filamentos subulados, bandeados de branco e azul. Opérculo membranoso, tubular, ereto, fimbriado no terço superior. Limen cupuliforme (CERVI, 1997) http://www.brazilplants.com/passifloraceae/passiflora-setacea-
Folhas	 Folhas simples, alternas, trilobadas ou com menor freqüência, inteiras ou bilobadas, de base cordada, ápice acuminado e margem serrilhada., Nos bordos encontram-se glândulas oval-elípticas. As folhas apresentam as três nervações mais desenvolvidas partindo da região basal da lâmina. O tamanho da folha varia de 7 a 12 cm de comprimento por 11 a 13 cm de largura, com superfície lisa e glabra. (BERALDO e KATO, 2010) https://www.google.com.br/search?q=fotos+folhas+passiflora+edulis&tbm	 Folhas de 5-8 × 6-10 cm, trilobadas (lóbulos oblongos ou oblongo-lanceolados), serreadas nos bordos, cordadas na base, trinervadas, membranáceas a subcoriáceas, normalmente pilosas em ambas as superfícies; tricomas macios ao tato; raramente glabras em uma das superfícies. Pedúnculos de 8-10 cm, robustos, articulados perto do ápice, tomentosos. Há a presença de gavinhas na região da inserção das folhas (CERVI, 1997).

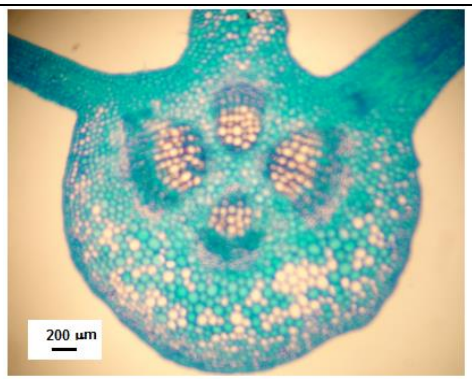
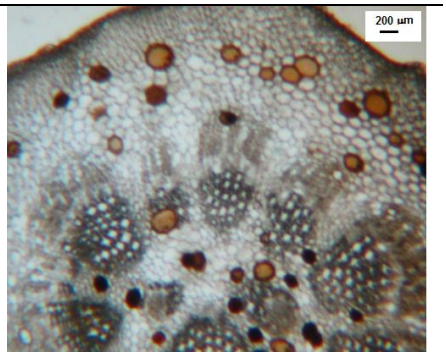
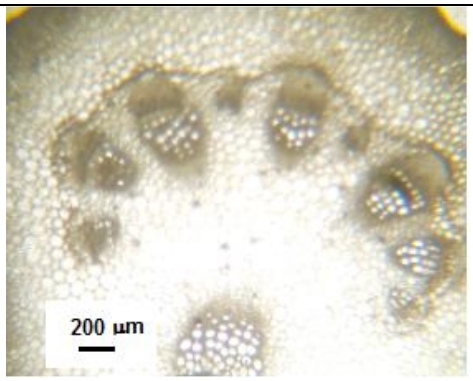
Diferenças macroscópicas (cont.)

	Passiflora edulis **Sims.**	*Passiflora setacea* **DC**
Pecíolos	 O pecíolo, de 2 a 3 cm de comprimento, cerca de 1 mm de diâmetro, mostra-se torcido próximo ao caule e provido de um par de nectários côncavos próximos à região basal da lâmina foliar (BERALDO e KATO, 2010) http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Estruturas_Secretora Ramos_Cardoso.pdf	 Pecíolos de 2 a 3 cm de comprimento, próximos à base foliar, com um par de glândulas sésseis (nectários), medindo cerca de 1 mm de largura. Presença de muitos tricomas tectores (CERVI, 1997)
Caules	 Caules de formato pentagonal. (BERALDO e KATO, 2010)	 Caules de formato arredondado, com muitos tricomas tectores (CERVI, 1997)

Diferenças microscópicas

	Passiflora edulis	*Passiflora setacea*
Pecíolo	 Pecíolo com lobos bem marcados (BERALDO e KATO, 2010)	 Pecíolo com lobos pouco diferenciados. Grande presença de tricomas tectores, uni e pluricelulares, unisseriados..
Caule	 Caule com formato predominantemente pentagonal (Beraldo & Kato, 2010). Foto: BERALDO e KATO, 2010	 Caule com formato predominantemente ovalado, com grande incidência de tricomas tectores uni e pluricelulares, unisseriados.
Folha	 Ausência de fibras perivasculares, na região dos feixes vasculares e no parênquima medular..	 Raras fibras perivasculares solitárias ou em grupos de 2-3, na região dos feixes vasculares e no parênquima medular.

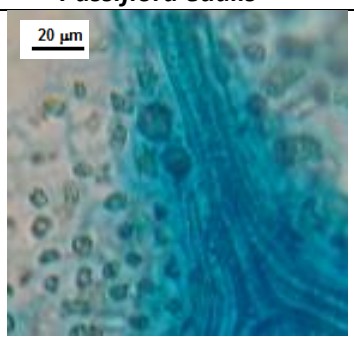
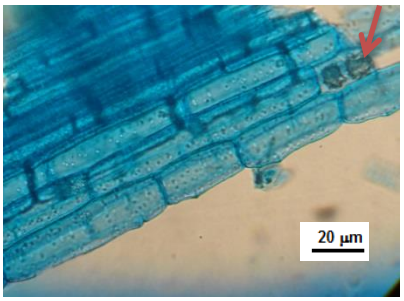
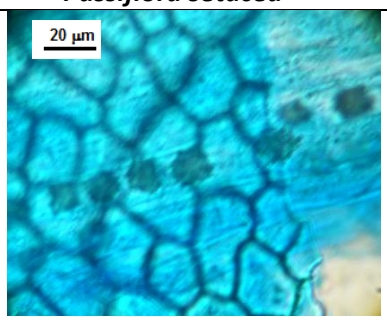
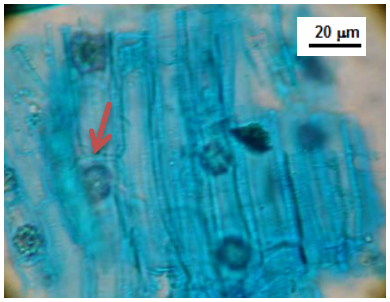
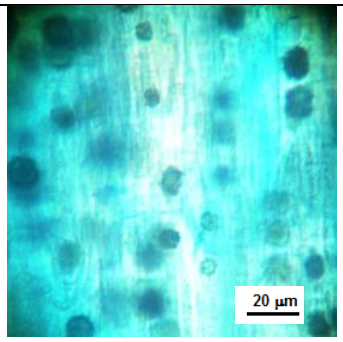
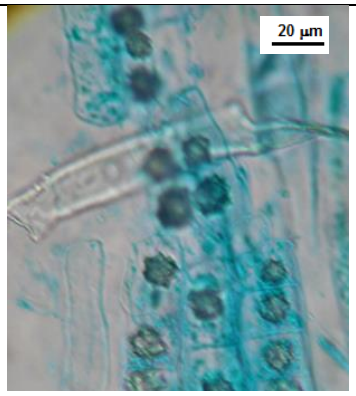
Diferenças microscópicas (cont.)

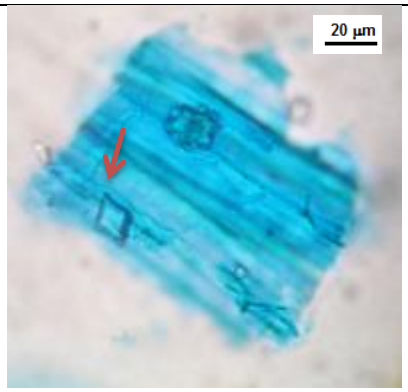
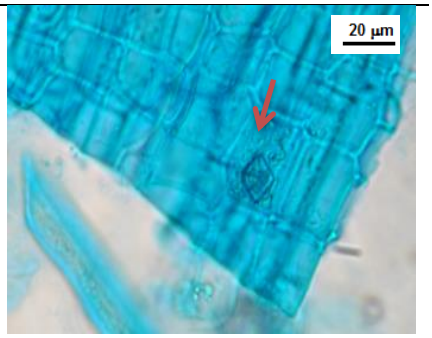
	Passiflora edulis	***Passiflora setacea***
Folha	 Não foi observada a presença de aglomerados de material com cor variando de amarelo a marrom, tanto na folha quanto no caule.	 Presença de vários aglomerados de material com cor variando de amarelo a marrom, tanto na folha quanto no caule.
Caule		

6.4.3. Dissociação do material vegetal

A dissociação do material vegetal da folha e caule de *Passiflora setacea* e de *Passiflora edulis* evidenciou a presença de drusas em grande quantidade e de raros cristais prismáticos:

Tabela 2 – Material dissociado de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*:

Dissociação		
	Passiflora edulis	***Passiflora setacea***
Folha	 Grande quantidade de drusas. Característico de Passifloras .(BERALDO e KATO, 2010)  Raros cristais prismáticos. (BERALDO e KATO, 2010).	 Grande quantidade de drusas.  Raros cristais prismáticos.
Caule	 Grande quantidade de drusas. Característico de Passifloras .(BERALDO e KATO, 2010)	 Grande quantidade de drusas.

Dissociação (cont.)	***Passiflora edulis***	***Passiflora setacea***
Caule	 Raros cristais prismáticos (BERALDO e KATO, 2010)	 Raros cristais prismáticos.

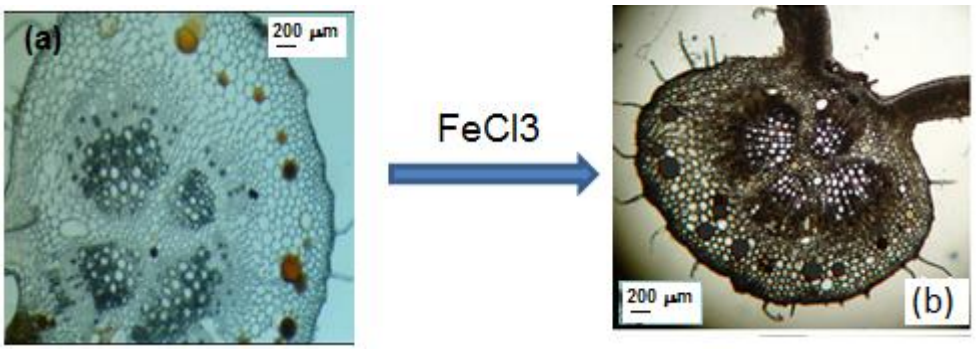
6.5. Testes histoquímicos

A folha e o caule de *Passiflora setacea* apresentaram vários pontos corados em tons que variaram de amarelo claro ate o laranja-amarronzado. Para tentar determinar a natureza deste material empregamos alguns reagentes e fizemos uso do microscópio Jenaval – Carl-Zeiss™, com luz polarizada cruzada.

6.5.1 - Nervura da folha de *Passiflora setacea*:

Teste com aplicação de reagente cloreto férrico no corte na folha, sem sofrer diafanização com hipoclorito de sódio. Após aplicação do reagente, os pontos corados em laranja ou amarronzados, presentes normalmente na folha, ficaram corados em verde escuro, o que é característico de compostos fenólicos, para este reagente. (PROENÇA DA CUNHA, 2009).

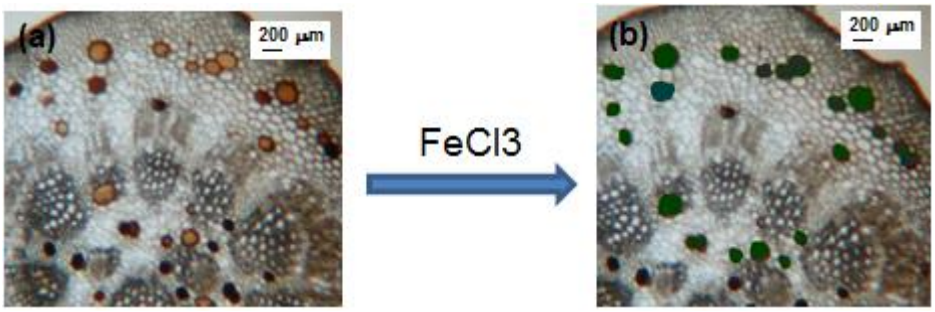
Figura 19. *Passiflora setacea* – Nervura principal - (a) – nervura principal da folha de *Passiflora setacea* tal qual (sem diafanização) e (b) – mesma nervura após tratamento com cloreto férrico. Fotos. A.R.Almeida



6.5.2 – Caule de *Passiflora setacea*:

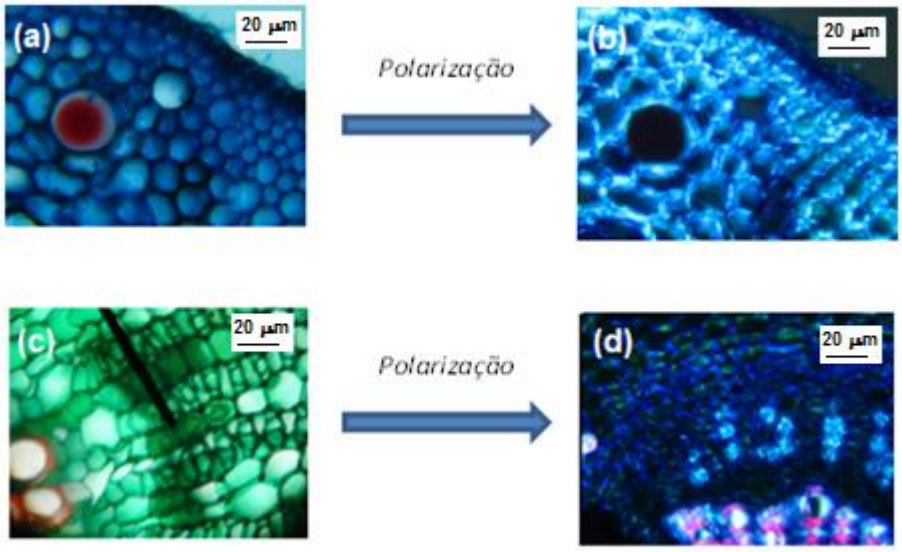
O caule de *Passiflora setacea* sofreu o mesmo tratamento anterior. O resultado obtido foi o mesmo.

Figura 20 . *Passiflora setacea* – Caule - (a) – caule de *Passiflora setacea* tal qual (sem diafanização) e (b) – mesmo caule após tratamento com cloreto férrico. Fotos. A.R.Almeida



Este mesmo caule foi submetido a análise por microscópio Jenaval, Carl Zeiss, com polarização cruzada. Fotos feitas com maquina Canon – PC 1252, DC 4,3 V. Com a polarização a substancia amarronzada não sofreu alteração, mas as células de colênquima, que são formadas principalmente de celulose, foram evidenciadas sob a luz polarizada (Figura 21-a e 21-b). As drusas, presentes no caule nos raios xilemáticos, foram bem evidenciadas, sob a ação da luz polarizada (Figuras 21-c e 21-d).

Figura 21. (a) caule de *Passiflora setacea* sem polarização, (b) mesma região do caule com polarização, (c) região dos feixes vasculares do caule com raios xilemáticos com drusas, (d) mesma região sob luz polarizada. Fotos. A.R.Almeida



6.6 - Triagem fitoquímica:

As plantas secas recebidas: *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*, possuíam o seguinte percentual de caules e folhas:

Passiflora edulis – peso total= 30,06 g – caules = 15,66 g (52%) – folhas = 14,40 g (48%)

Passiflora setacea – peso total= 13,53 g – caules= 9,64 g (71%) – folhas = 3,89 g (29%)

As drogas foram secas a 40º C por 48 horas em uma estufa com circulação forçada de ar, da marca Fabbe® e sofreram o processo de trituração, para obtenção de partículas de tamanho reduzido e uniforme. Para tal foram usados moinhos de facas e martelos (marca Thomas®) e tamises (1 mm). Para cada amostra recebida foram realizadas extrações, da forma adequada para a análise em questão, que foram submetidas aos testes para determinação da presença de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas e cumarinas*:*

6.6.1 - Alcaloides:

Foram pesadas 10,0 g das amostras (*Passiflora edulis* – caule, folha e caule+folha e *Passiflora setacea* – caule, folha e caule+folha), agitadas por 15 minutos com 15 mL de acido sulfúrico 0,3% e filtradas. O filtrado foi lavado com acido sulfúrico 0,3% ate um volume total de 20 mL. Alcalinizou-se com amônia concentrada. A mistura foi extraída com 2 porções de 10 mL de éter dietilico. O éter foi filtrado através de algodão com sulfato de sódio anidro, evaporado até secura e redissolvido com 0,5 mL de metanol.

A presença de alcaloides foi testada com os seguintes reativos: (WAGNER e BLADT, 1996)

- Bertrand (acido silicotungstico a 5%) – negativo

- Bouchardat (solução aquosa de iodo em iodeto de potássio) – negativo

- Dragendorff (solução aquosa de acido nítrico 6%, subnitrato de bismuto 8% e iodeto de potássio a 23%) – negativo

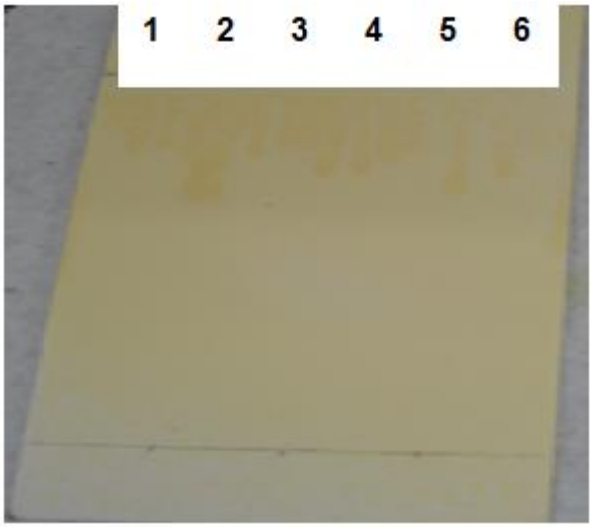
- Mayer (solução de cloreto férrico a 1,3% e iodeto de potássio a 5%) – negativo.

Cromatografia em camada delgada (CCD) para detecção de alcaloides:

O material obtido da extração dos alcaloides foi aplicado na placa de sílica para detecção de alcaloides.

Fase móvel = Clorofórmio: MeOH : NH3 10% - (80:40:1,5) (WAGNER e BLADT, 1996)

Figura 22 . Teste para alcaloides – Fase mpvel: Cloroformio: MeOH: NH3 10% - Placa revelada com Dragendorff . Fotos. A.R.Almeida



Sequencia de aplicação:
1 – *P. edulis folha*
2 – *P. edulis caule*
3 – P. edulis caule + folha
4 – *P. setacea folha*
5 – P. setacea caule
6 – P. setacea caule + folha

Não foram observados resultados positivos para nenhuma das amostras analisadas, mesmo empregando amostras bem concentradas.

6.6.2 - Flavonoides:

A presença de flavonoides nas soluções à 20 % em álcool 70 %, obtidas a partir de somente folhas e somente caules de *Passiflora setacea* e de *Passiflora edulis,* foi determinada com os seguintes reagentes*:* (WAGNER e BLADT, 1996, PROENÇA DA CUNHA, 2009).

- Cloreto de alumínio e leitura a 365 nm – positivo
- Shinoda (cianidina) – positivo
- Reação com hidróxidos alcalinos – positivo

Cromatografia em camada delgada (CCD) para detecção de flavonoides:

Para esta analise por CCD, do extrato bruto das plantas, foram adicionados os padrões de Rutina e Quercetina:

Figura 23 . Estruturas da Rutina e da quercetina (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

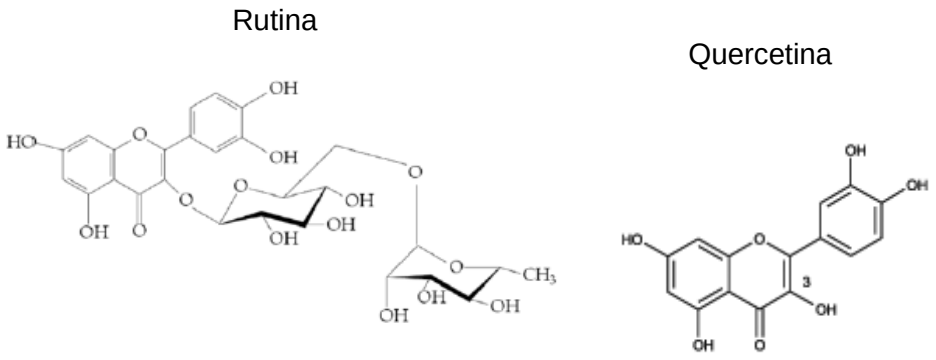


Figura 24 . Teste para flavonoides - (a) Placa revelada com NP e visualizada em UV 366 nm e (b) Placa revelada com Anisaldeido sulfúrico. Fase móvel 1: Acetato de etila: H2O: Acido acético : Acido fórmico (100:26:11:11) Fotos. A.R.Almeida

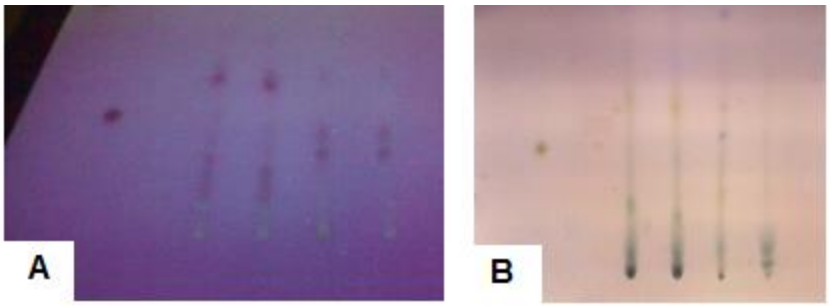
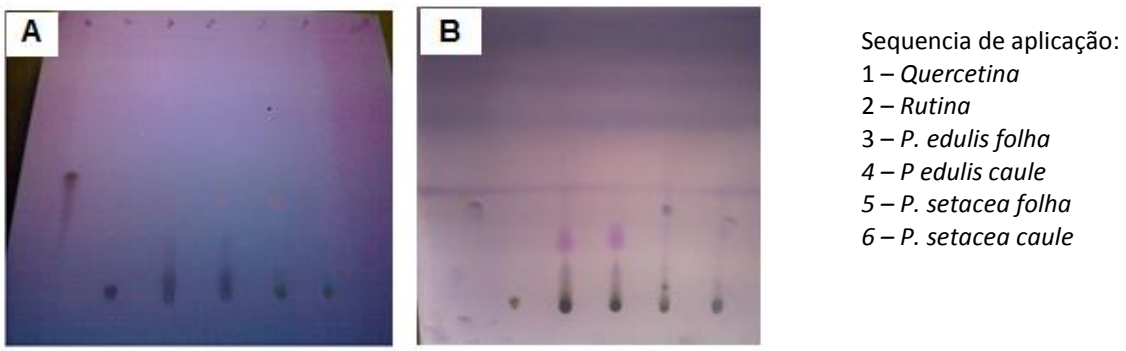


Figura 25 . Teste para flavonoides - (a) Placa revelada com NP e visualizada em UV 366 nm e (b) Placa revelada com Anisaldeido sulfúrico. Fase móvel 2: Tolueno: Formiato de etila: Acido fórmico (50:40:10). Fotos. A.R.Almeida



6.6.3 – Taninos:

Foi verificada a presença de taninos nas soluções aquosas obtidas a partir de somente folhas e somente caules e na mistura de folhas e caules de *Passiflora setacea* e de somente folhas e somente caules e na mistura de folhas e caules de *Passiflora edulis,* de acordo com os seguintes testes*:* (PROENÇA DA CUNHA, 2009).

- Reação com sais de ferro – *Passiflora edulis* , *Passiflora setacea* folhas e caules – positivo

- Reação com acetato de chumbo – positivo

- Reação com acetato de cobre – positivo

- Reação com alcaloides (sulfato de quinina) – positivo

Passiflora edulis e Passiflora setacea – Foram pesadas 3 g de cada uma das amostras que sofreram extração com 10 mL de agua à quente. Cada amostra foi filtrada e concentrada a aproximadamente 1 mL. Esta solução foi aplicada na placa de CCD.

- Fase móvel 1 : alcool terc-butílico: acido acético : H_2O (3:1:1)
- Fase móvel 2 : acido acético 6% (STHAL, 1967)

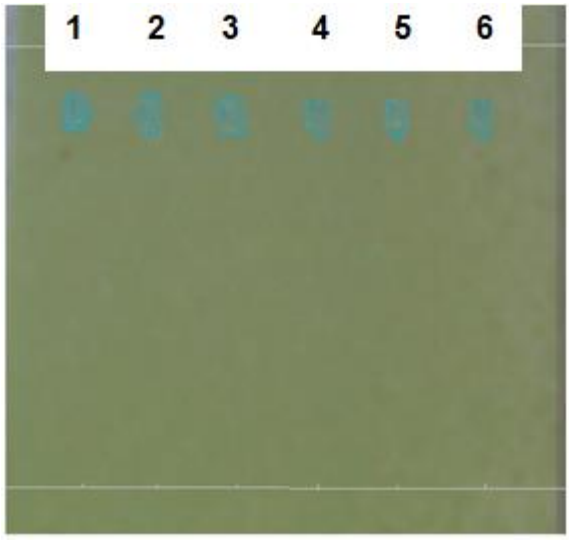
Revelador:

- $FeCl_3$ 10 % em etanol
- Ferricianeto de potassio à 50 % etanol (K_3FeCN_6 – solução saturada)
- Spray – mistura 1:1

Figura 26 . Teste para taninos - Placa revelada com $FeCl_3$ e ferricianeto de potássio.

Uso de 2 fases moveis em sequencia:

- Fase móvel 1 : alcool terc-butílico: acido acético : H2O (3:1:1)
- Fase móvel 2 : acido acético 6% (STHAL, 1967) Fotos. A.R.Almeida



Revelador:
- FeCl3 10 % em etanol
- Ferricianeto de potassio à 50 % etanol (K3FeCN6 – solução saturada)
- Spray – mistura 1:1

Sequencia de aplicação:
1 – *P. edulis folha*
2 – *P. edulis caule*
3 – P. edulis caule + folha
4 – *P. setacea folha*
5 – P. setacea caule
6 – P. setacea caule + folha

6.6.4. Saponinas:

Para verificar a presença de saponinas, foi utilizado o teste de espuma (COSTA, 2001) em todas as amostras com resultado negativo.

6.6.5. Cumarinas:

Cumarinas: visualização em solução alcalina com aparecimento de coloração amarela, e visualização do extrato sob a luz UV (fluorescência azul ou verde) (SIMÕES et al, 2006): o teste foi realizado em todas as amostras com resultado negativo.

6.7 Preparo do extrato bruto e das frações

O extrato bruto foi preparado conforme descrito no item 5.2. O processo extrativo utilizado foi o de percolação. O peso inicial das plantas foi de 2400,0 g de *Passiflora edulis* e 3600,0 g de *Passiflora setacea*. Os rendimentos obtidos estão na tabela 3.

Tabela 3. Rendimento do extrato bruto e das frações em agua e acetato de etila.

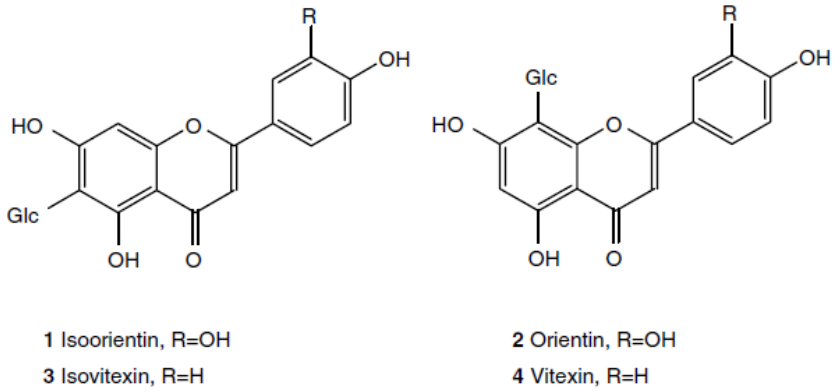
Espécie vegetal	*Passiflora edulis*	*Passiflora setacea*
Peso inicial (droga vegetal) em gramas	2400,0	3600,0
Massa do extrato bruto liofilizado (EHEL) (g)/ Rendimento (%)	415,2/17,3	675/18,75
Massa da fração aquosa (g)/Rendimento (%)	396/16,5	646,4/18,0
Massa da fração acetato de etila (g)/Rendimento (%)	6,72/0,28	8,64/0,24

6.8 Análises cromatográficas por CLAE/DAD/MS

Os extratos e frações da Tabela 3 foram utilizados para analise de CLAE (cromatografia liquida de alta eficiência) com detector de arranjos de diodos (DAD) e detector espectrofotométrico de massas Bruker (MS).

Em *Passiflora edulis* a presença de derivados glicosilados de apigenina e luteolina, tais como orientina (luteolina-8-C-glicosideo – $C_{21}H_{20}O_{11}$), isoorientina, vitexina (apigenina-8-C-glicosideo – $C_{21}H_{20}O_{10}$) e isovitexina são comumente reportados como compostos majoritários (ABOURASHED et al., 2002; DHAWAN et al., 2004).

Figura 27. Estruturas de alguns flavonoides C-glicosilados encontrados em *Passiflora edulis* (PEREIRA et al, 2005)

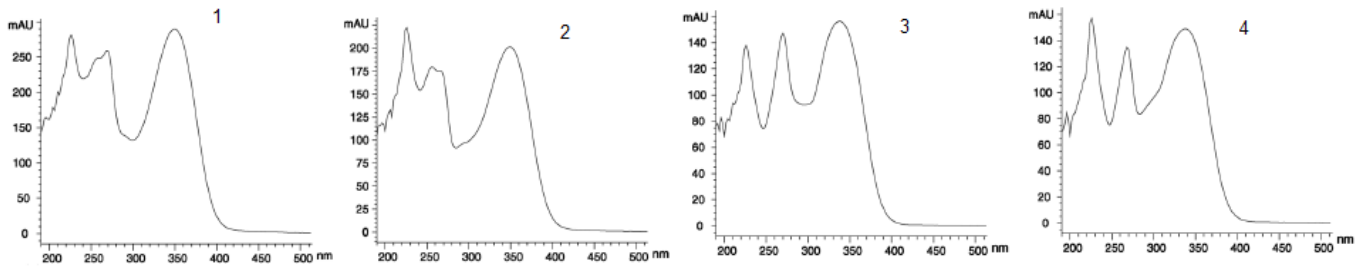


1 Isoorientin, R=OH
3 Isovitexin, R=H

2 Orientin, R=OH
4 Vitexin, R=H

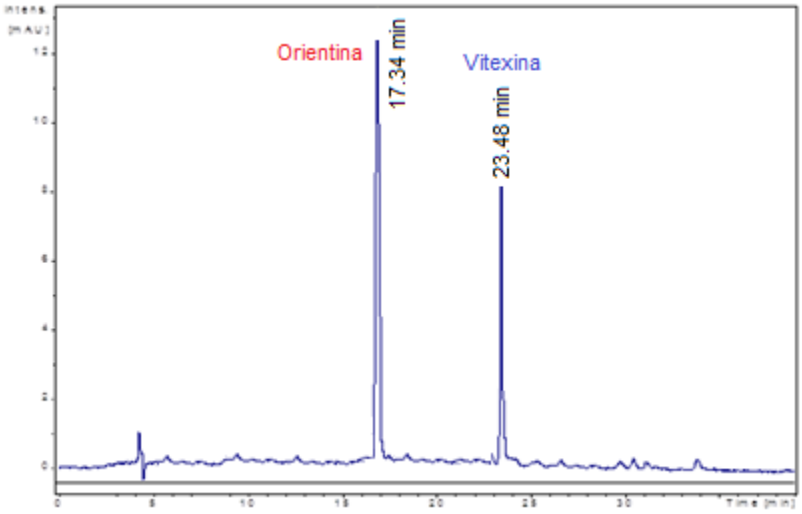
Estes compostos foram separados e identificados por CLAE usando primeiramente os padrões de vitexina e orientina e os espectros de UV/vis obtidos com o detector de DAD, conforme mostrado na figura 28.

Figura 28. Espectros de flavonoides glicosilados encontrados em *Passiflora edulis* – 1 = Isoorientina, 2 = orientina, 3 = isovitexina e 4 = vitexina (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).



Primeiramente foram separados os padrões de vitexina e orientina por CLAE conforme figura 29:

Figura 29. Mistura de padrões: vitexina e orientina. CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Cromatogramas obtidos a 330 nm.



Nas figuras seguintes são observados os picos produzidos nas analises de CLAE a 330 nm para cada extrato e fração obtidos para as duas espécies de Passifloras.

Figura 30. Extrato bruto (EHEL) de *Passiflora edulis*. CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Cromatogramas obtidos a 330 nm.

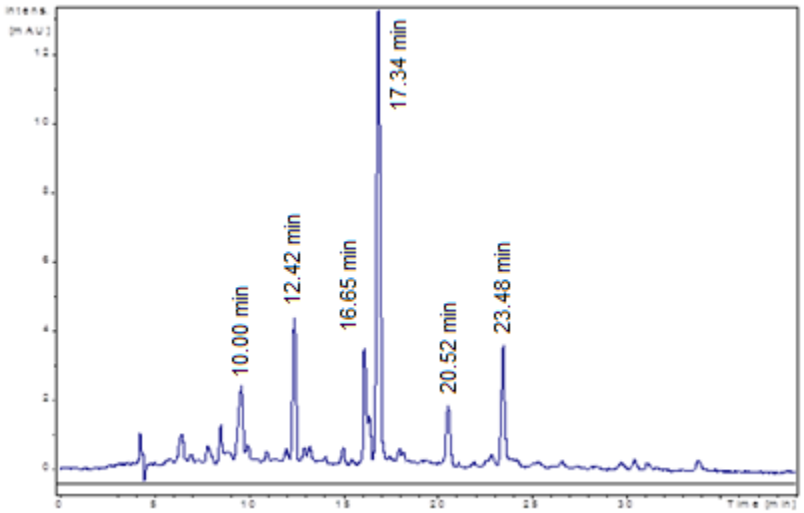
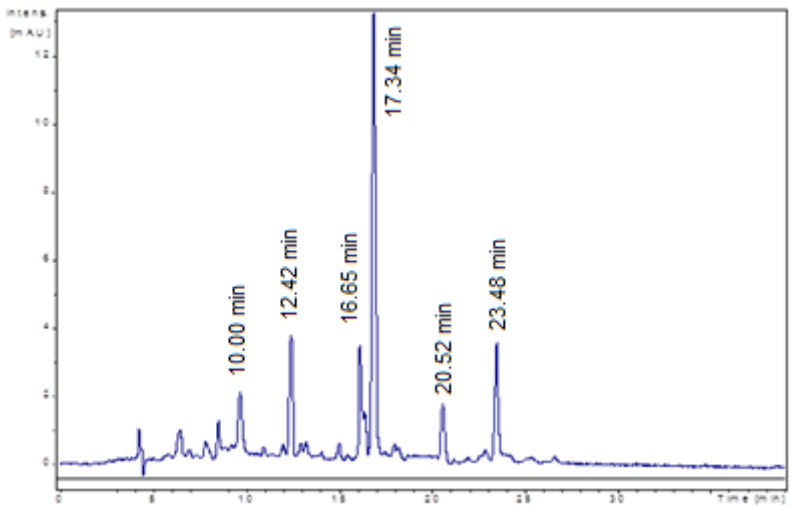


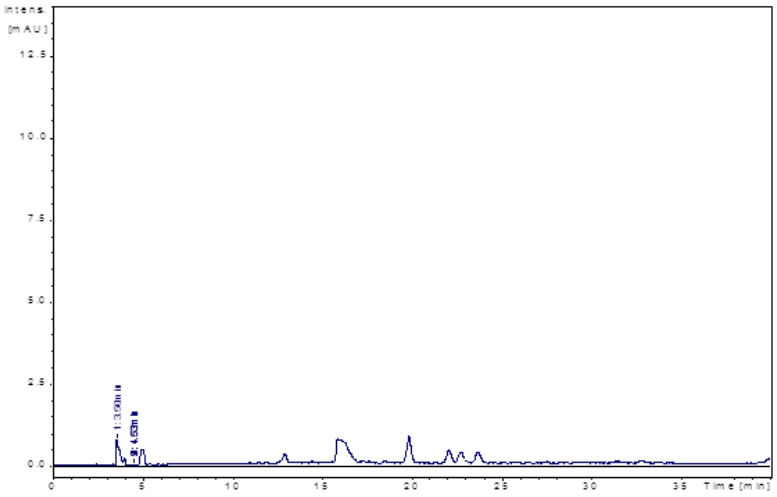
Figura 31. Fração aquosa de *Passiflora edulis*: CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Cromatogramas obtidos a 330 nm.



O extrato bruto (EHEL) e a fração aquosa obtidas de *Passiflora edulis* têm composição muito semelhante. A fração acetato de etila (figura 32) mostrou poucos componentes e em quantidade muito pequena. Isto pode ser devido à presença predominante de flavonoides-C-glicosilados em *Passiflora edulis* e que não são solúveis neste solvente (pouco polar).

Figura 32. Fração acetato de etila de *Passiflora edulis.* CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Cromatogramas obtidos a 330 nm.

:



Na CLAE/MS de *Passiflora edulis* para os picos com tempo de retenção de 16,6 e 17,3 minutos, obtivemos espectros de massas muito semelhantes e compatíveis com orientina e/ou isoorientina, conforme literatura (PEREIRA, et al, 2005, COLOMBO, et al, 2008):

Figura 33. Espectro de massas obtido para o pico com tempo de retenção de 16,6 min. CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Detector Bruker Esquire 3000 Plus – Ion trap – 65 V – modo positivo – ESI.

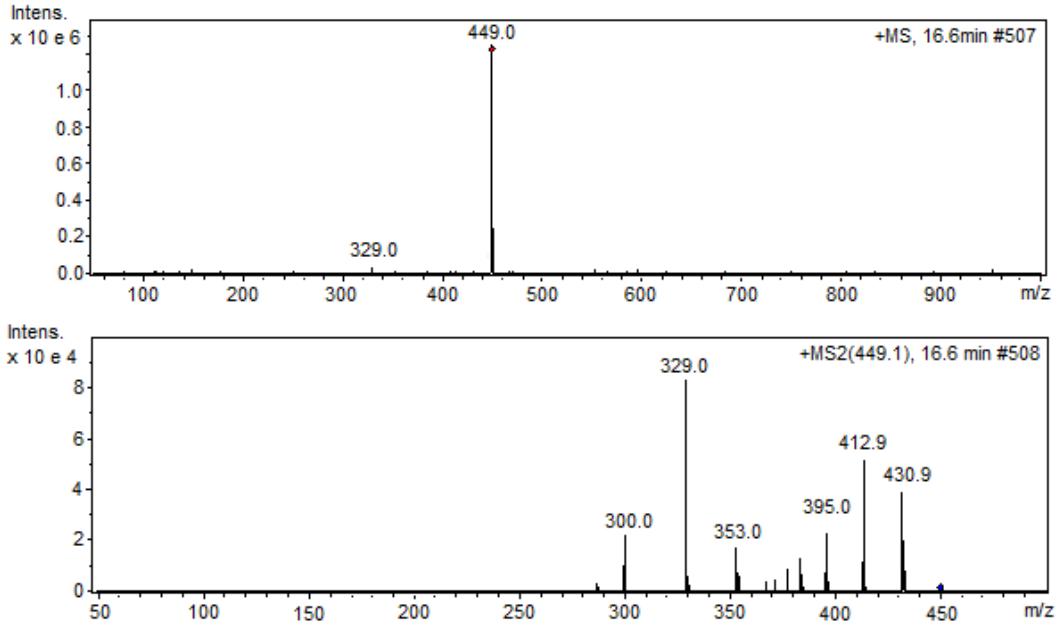
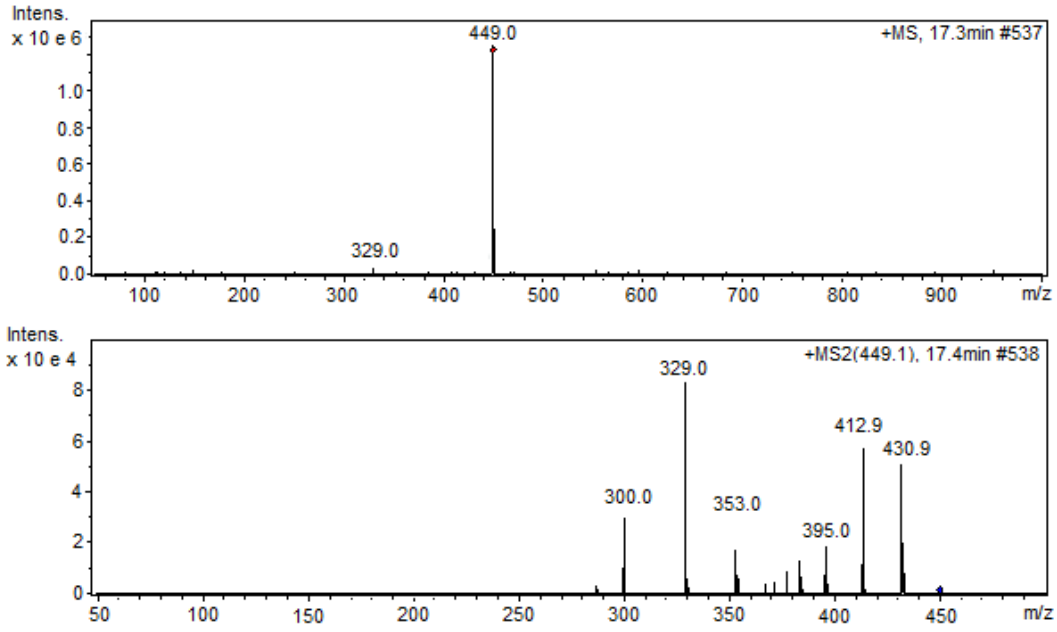


Figura 34. Espectro de massas obtido para o pico com tempo de retenção de 17,3 min. CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Detector Bruker Esquire 3000 Plus – Ion trap – 65 V – modo positivo – ESI.

.



E para os picos com tempo de retenção de 20,5 e 23,5 minutos, foram obtidos os seguintes espectros de massas, compatíveis com vitexina e/ou isovitexina conforme literatura (PEREIRA, et al, 2005, COLOMBO, et al, 2008)::

Figura 35. Espectro de massas obtido para o pico com tempo de retenção de 20,5 min. CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Detector Bruker Esquire 3000 Plus – Ion trap – 65 V – modo positivo – ESI.

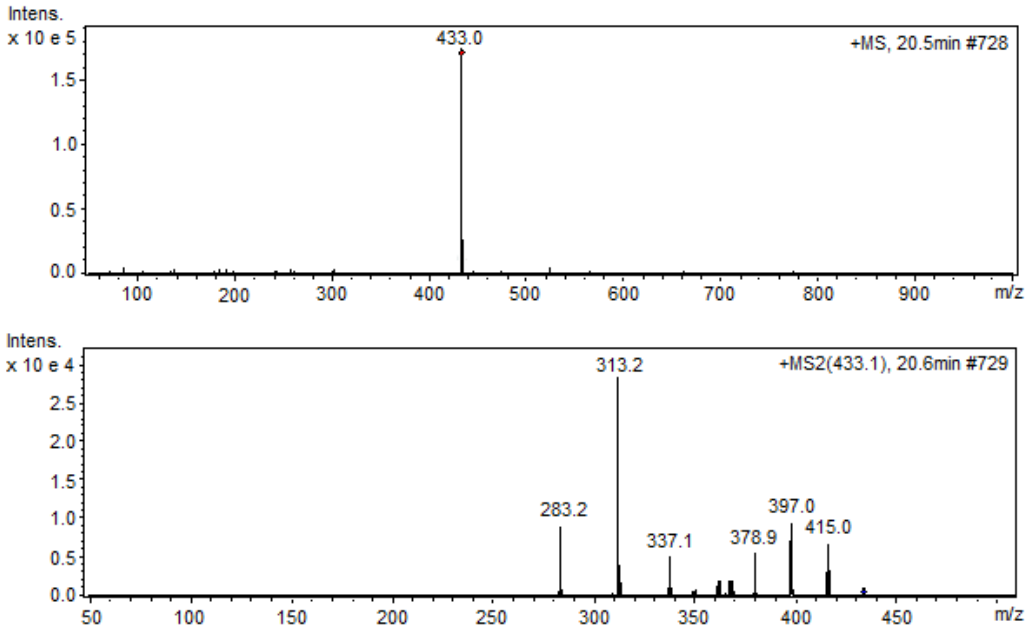
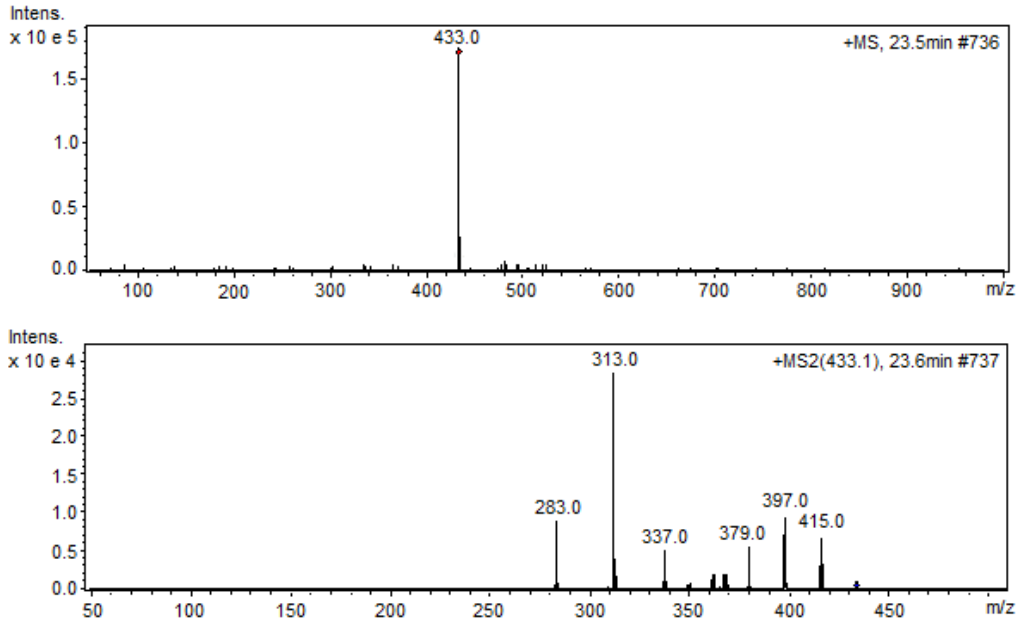
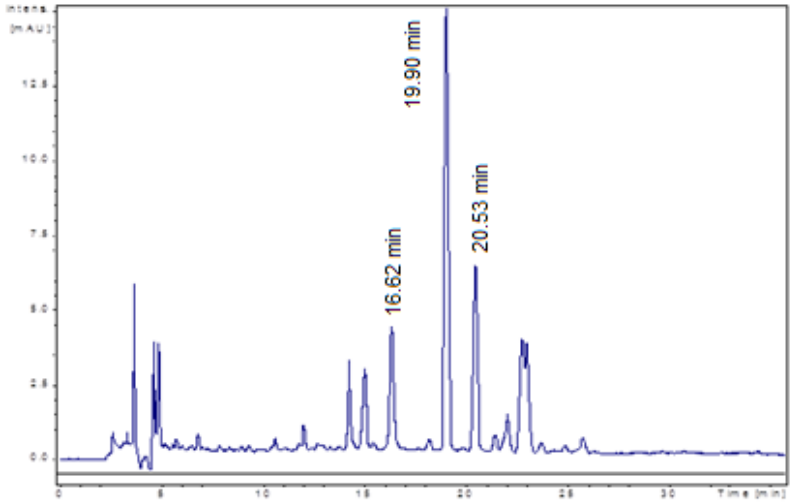


Figura 36. Espectro de massas obtido para o pico com tempo de retenção de 23,5 min. CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Detector Bruker Esquire 3000 Plus – Ion trap – 65 V – modo positivo – ESI.



O mesmo trabalho foi realizado para *Passiflora setacea,* procurando separar e identificar cada um dos picos majoritários. Foram empregadas as mesmas condições utilizadas para *Passiflora edulis*, para a CLAE/DAD/MS.

Figura 37. Extrato bruto (EHEL) de *Passiflora setacea*. CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Cromatogramas obtidos a 330 nm.



:

Figura 38. Fração aquosa de *Passiflora setacea.* CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Cromatogramas obtidos a 330 nm.

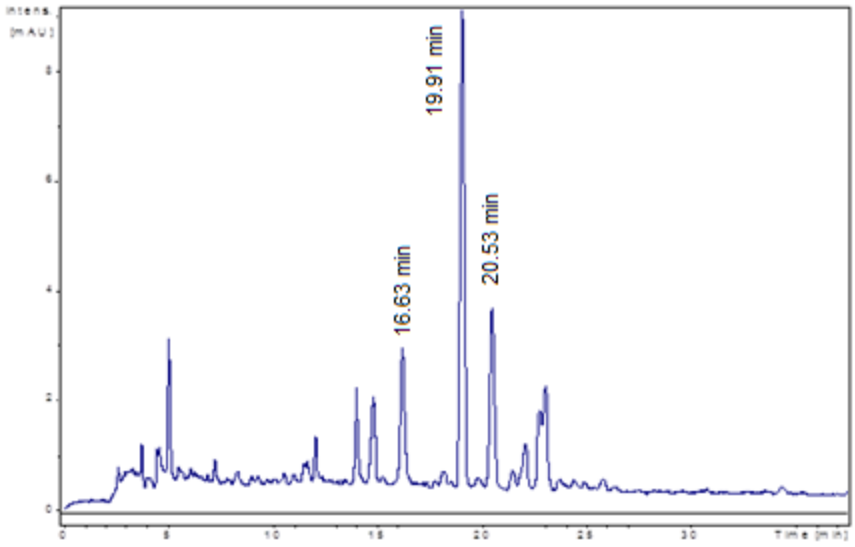
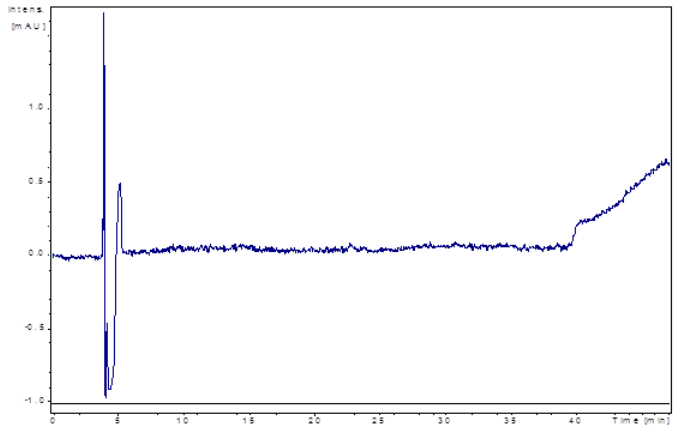


Figura 39. Fração acetato de etila de *Passiflora setacea.* CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Cromatogramas obtidos a 330 nm.

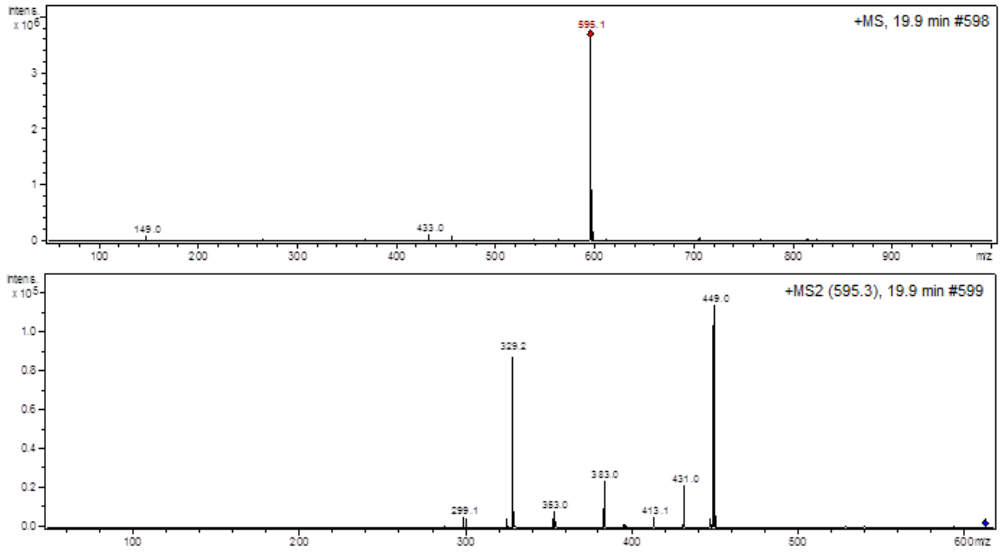


Conforme podemos observar as composições do extrato bruto (EHEL) e da fração aquosa de *Passiflora setacea* também são muito semelhantes. A análise da fração em acetato de etila demonstrou a ausência de flavonoides, provavelmente porque os principais flavonoides encontrados em *Passiflora setacea* também estão na forma C-glicosilada.

Os picos observados na CLAE de *Passiflora setacea* com tempos de retenção de 16,6 minutos e 23,5 minutos também apresentaram os mesmos espectros de massas observados no caso de *Passiflora edulis* e, portanto compatíveis com orientina/isoorientina e vitexina/isovitexina, respectivamente.

O pico observado em 19,90 minutos em *Passiflora setacea* apresentou um espectro de massas diferente dos observados até o momento conforme mostrado na figura 40:

Figura 40. Espectro de massas obtido para o pico com tempo de retenção de 19,9 min. observado em *Passiflora setacea.* CLAE: equipamento Shimadzu com fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear de agua com 0,2% de acido fórmico (solvente A) e acetonitrila com 0,2% de acido fórmico (solvente B) - 0-10 min - 12% de B em A e 10-30 min - 20% de B em A. Detector Bruker esquire 3000 Plus – Ion trap – 65 V – modo positivo – ESI.



Este pico também foi separado por CLAE semi-preparativa e obteve-se um pó amorfo de cor amarelo-acastanhado que foi submetido a analise por RMN de H^1 (500 MHz, solvente = DMSO – d6) e C^{13} (125 MHz – solvente = DMSO – d6), conforme figuras 41 e 42 e tabela 4:

Figura 41. Espectro de RMN H[1] do composto obtido por separação por CLAE de *Passiflora setacea* em 19,9 min. com expansões para melhor visualização do espectro. Espectrofotômetro Bruker 500 MHz. Solvente = DMSO-d6.

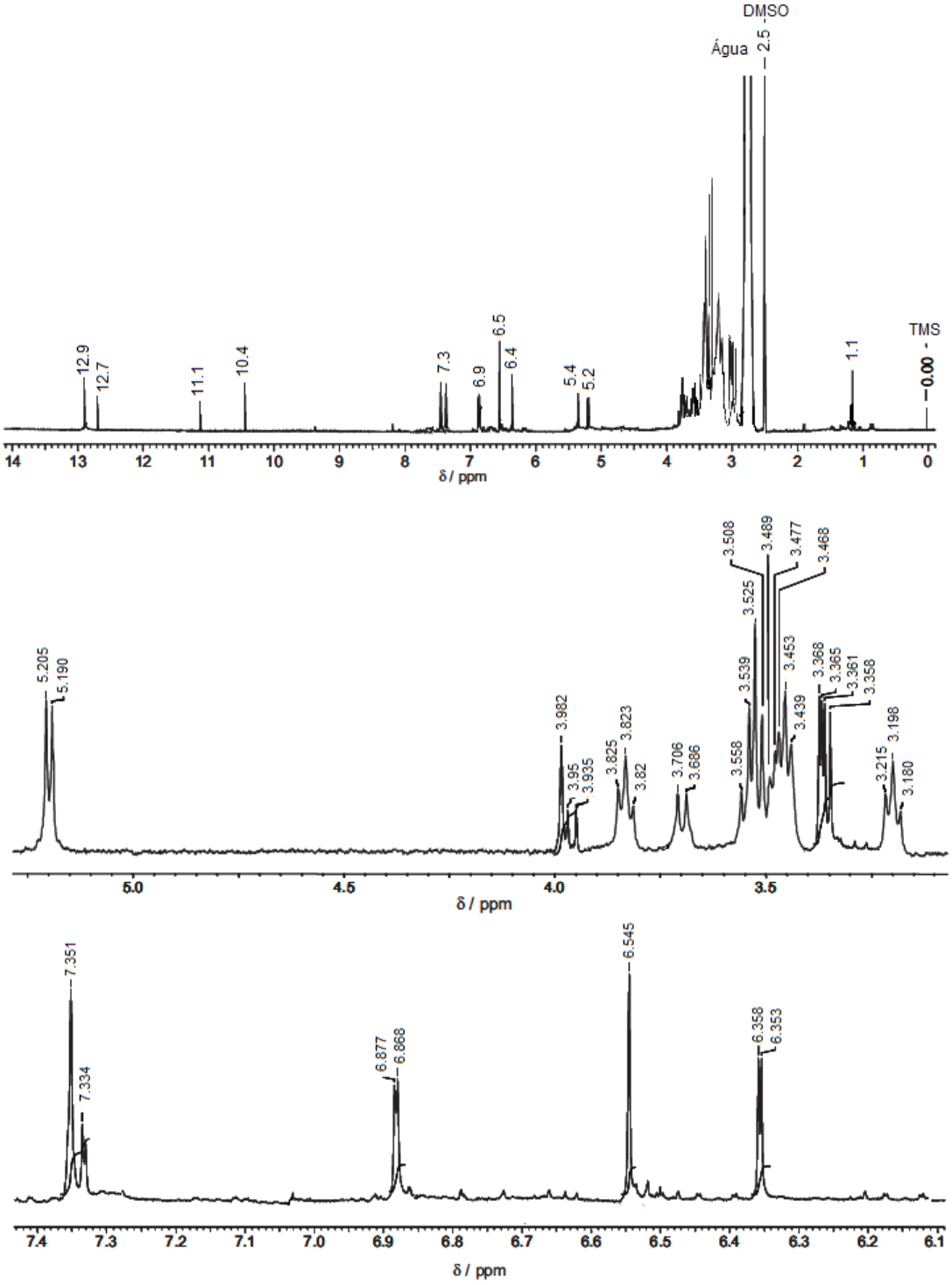


Figura 42. Espectro de RMN C^{13} (125 MHz) do composto obtido por separação por CLAE de *Passiflora setacea* em 19,9 min com expansão evidenciando os carbonos da aglicona. Espectrofotômetro Bruker 500 MHz – C^{13} – 125 MHz. Solvente: DMSO-d6

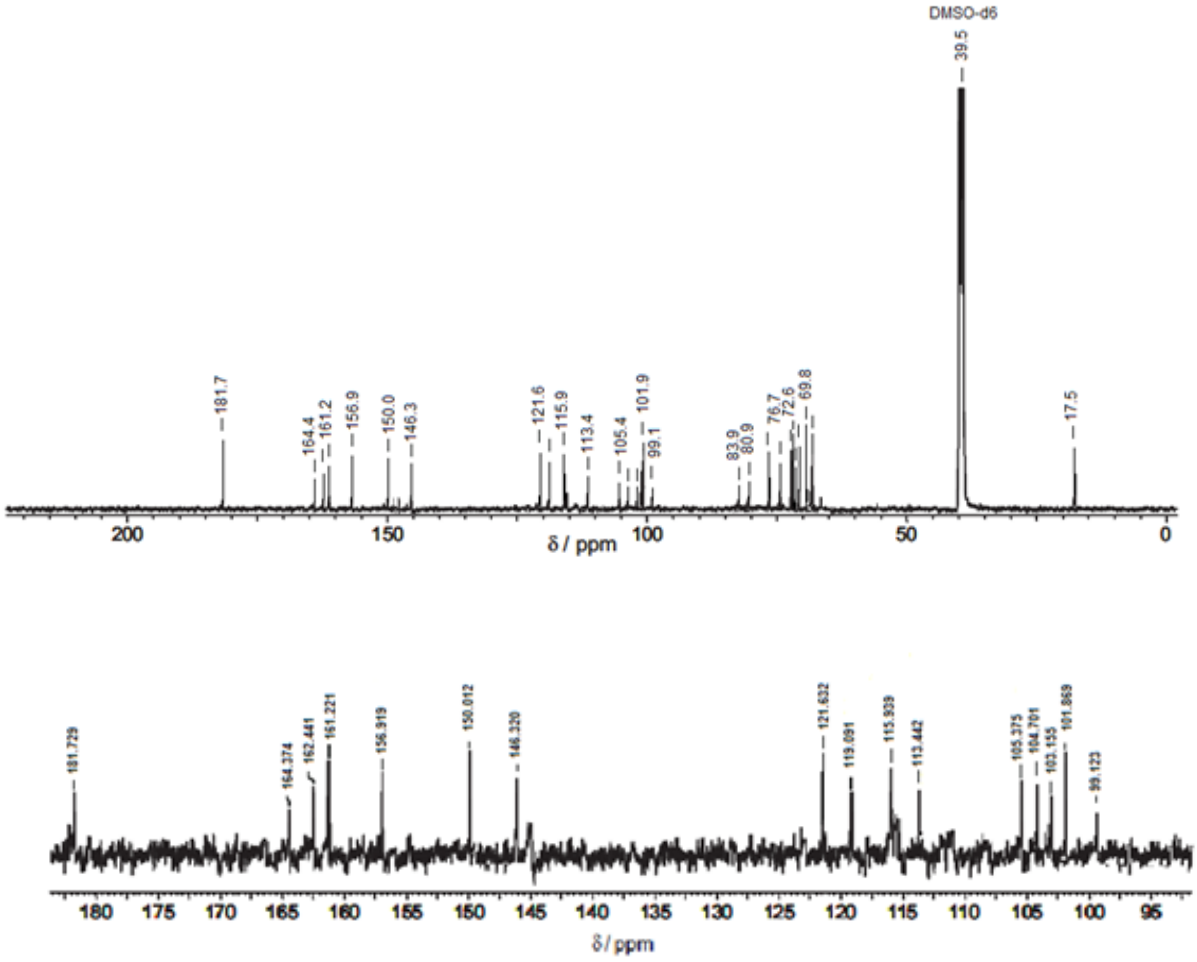


Tabela 4 - Deslocamentos de RMN de H^1 (500 MHz) e C^{13} (125 MHz) do composto isolado de *Passiflora setacea* (EHEL e fração aquosa)

Posição	**Isolado**		**Literatura (AKSNES et al, 1996, OSTERDAHL, 1976, ZHOU et al, 2005, ANDERSEN e MARKHAM, 2006, SCOTTI et al, 2011)**	
	RMN H^1 (DMSO d6)	RMN C^{13} (DMSO d6)	RMN H^1 (DMSO d6)	RMN C^{13} (DMSO d6)
	δ (ppm) multi, *J* (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm) multi, *J* (Hz)	δ (ppm)
Aglicona				
2	------	164,4	------	164,6
3	6,56 (s)	103,2	6,59 (s)	102,4
4	-------	181,7	------	182,0
5	12,91 (s)	161,2	12,96 (s)	160,5
6	6,36 (d, *J* = 2,0)	99,1	6,40 (d, *J* = 2,1 Hz)	98,3
7	12,73 (s)	162,4	12,80 (s)	162,8
8	-------	104,7	------	104,7
9	-------	156,9	------	156,0
10	-------	105,4	------	104,0
1'	------	121,6	------	122,0
2'	7,35 (d – *J* = 2,0)	113,4	7,44 (d – *J* = 2,1)	114,1
3'	11,12 (s)	146,3	11,32 (s)	146,0
4'	10,41 (s)	150,0	10,32 (s)	149,9
5'	6,88 (d – *J* = 8,0)	115,9	6,90 (d – *J* = 8,2)	115,8
6'	7,34 (1H, dd – *J* = 2,0 e 8,0)	119,1	7,50 (dd – *J* = 2,1 e 8,0)	119,5
Glicose				
1"	5,20 (d – *J* = 9,5)	73,4	4,72 (d – *J* = 9,0)	73,5
2"	3,52 (m)	70,8	3,48 (m)	70,9
3"	3,45 (m)	76,7	3,45 (m)	78,9
4"	3,20 (m)	69,8	3,22 (m)	70,8
5"	3,48 (m)	83,2	3,50 (m)	82,0
6"	3,50 (m) ou 3,71 (d)	69,5	3,50 (m) ou 3,71 (d)	69,3
Ramnose				
1*	5,38 (s)	101,86	5,3 (s)	102,40
2*	3,98 (m)	80,9	4,02 (m)	81,1
3*	3,82 (t – *J* = 3,6; 9,5)	70,4	3,89 (dd – *J* = 3,7; 9,7)	70,8
4*	3,37 (dd – *J* = 9,6; 9,6)	72,6	3,35 (dd – *J* = 9,7; 9,7)	73
5*	3,68 (d – *J* = 9,6)	72,3	3,87 (dd – *J* = 9,7; 6,2)	71,9
6*	1,10 (d – *J* = 6,1)	17,5	1,1 (d – *J* = 6,2)	17,8

6.9 Quantificação de flavonoides totais

A quantificação de flavonoides foi realizada para o extrato bruto, fração aquosa e fração acetato de etila de *Passiflora edulis e Passiflora setacea*. Vitexina foi utilizada como padrão externo para a construção da curva de calibração por ser um C-glicosil-flavonoide presente nas duas espécies analisadas.

Abaixo seguem os resultados (figura 43 e tabelas 5 e 6):

Figura 43 . Curva de calibração usando vitexina para calculo de flavonoides totais em *Passiflora edulis e Passiflora setacea.*

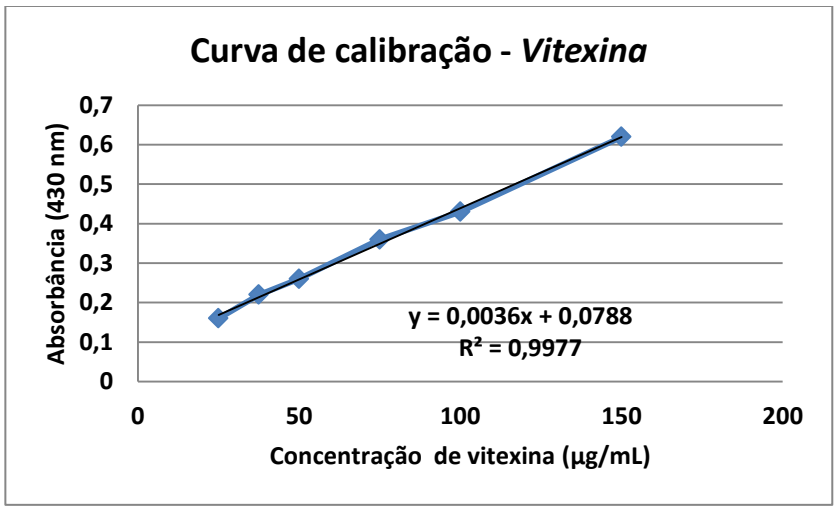


Tabela 5 – Teores de flavonoides totais expressos em vitexina em *Passiflora edulis*

Espécie vegetal	*Passiflora edulis*	Flavonoides totais (g) em vitexina ± erro padrão	Porcentagem (%)
Peso inicial (planta seca) em gramas	2400,0		
Massa do extrato bruto liofilizado (EHEL) (g)/ Rendimento (%)	415,2/17,3	2,21±0,04	0,53
Massa da fração aquosa (g)/Rendimento (%)	396/16,5	2,12±0,03	0,54
Massa da fração acetato de etila (g)/Rendimento (%)	6,72/0,28	------	------

Tabela 6 – Teores de flavonoides totais expressos em vitexina em *Passiflora setacea*

Espécie vegetal	*Passiflora setacea*	Flavonoides totais (g) em vitexina ± erro padrão	Porcentagem (%)
Peso inicial (planta seca) em gramas	3600,0		
Massa do extrato bruto liofilizado (EHEL) (g)/ Rendimento (%)	675/18,75	3,18±0,04	0,47
Massa da fração aquosa (g)/Rendimento (%)	646,4/18,0	3,07±0,03	0,47
Massa da fração acetato de etila (g)/Rendimento (%)	8,64/0,24	------	------

6.10 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do DPPH• radical pelos antioxidantes presentes na amostra. A curva padrão foi preparada com uma solução de Trolox® em varias concentrações (µg/mL) para determinar as porcentagens de descoramento.

Figura 44 . Curva de calibração de Trolox® utilizado como padrão externo para calculo da capacidade antioxidante dos extratos brutos e frações aquosas de *Passiflora edulis e Passiflora setacea.*

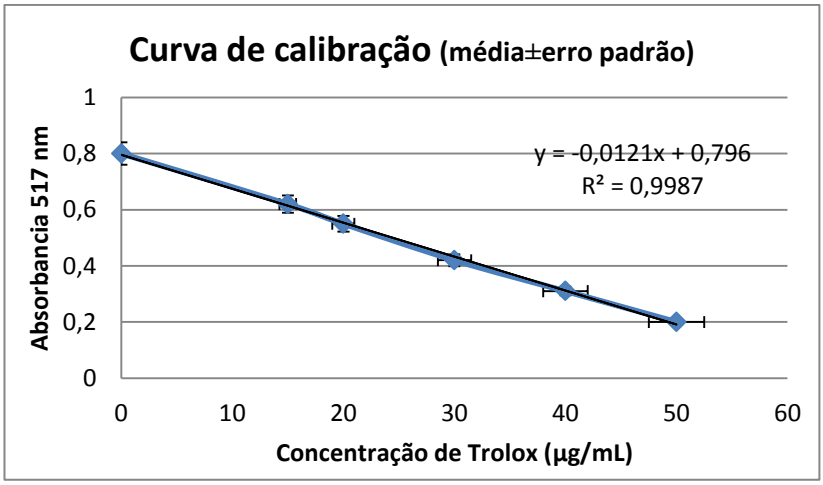


Figura 45 . Curva de calibração da porcentagem de redução de DPPH• radical referente à concentração do padrão externo Trolox.®

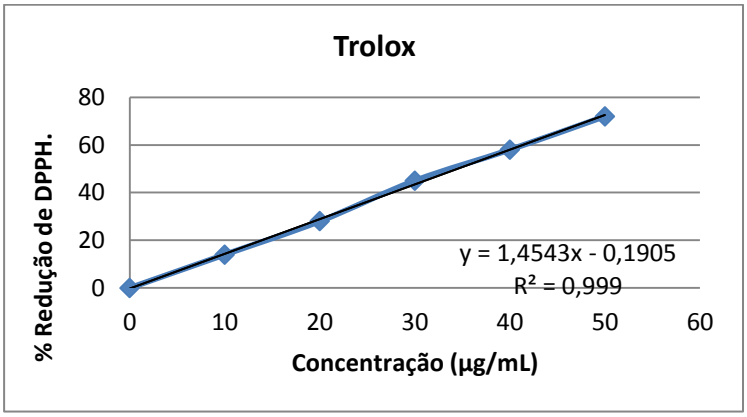


Figura 46 . Curva de porcentagem de redução do DPPH• radical referente à concentração do extrato bruto (EHEL) de *Passiflora edulis*.

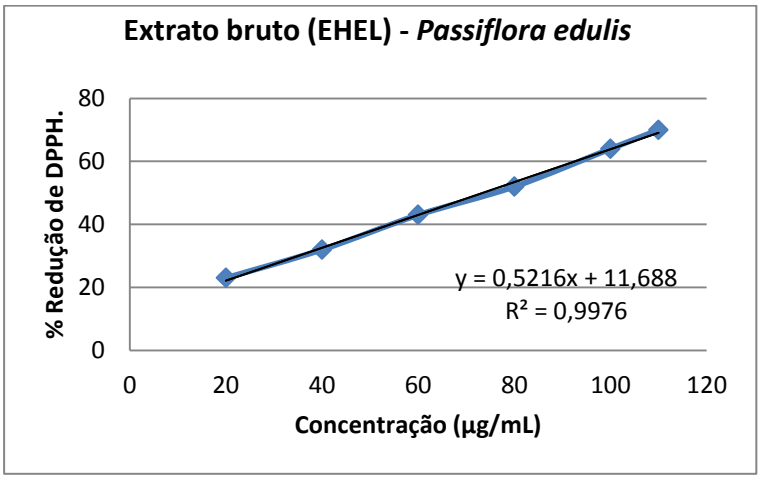


Figura 47 . Curva de porcentagem de redução do DPPH• radical referente à concentração da fração aquosa de *Passiflora edulis*.

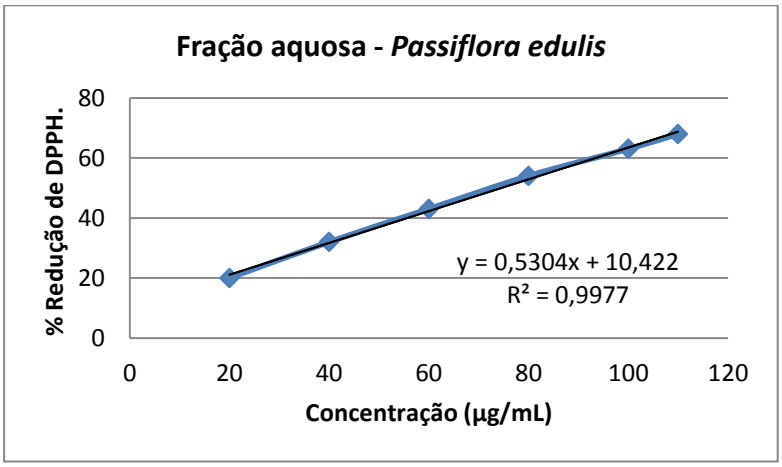


Figura 48. Curva de porcentagem de redução do DPPH• radical referente à concentração do extrato bruto (EHEL) de *Passiflora setacea*.

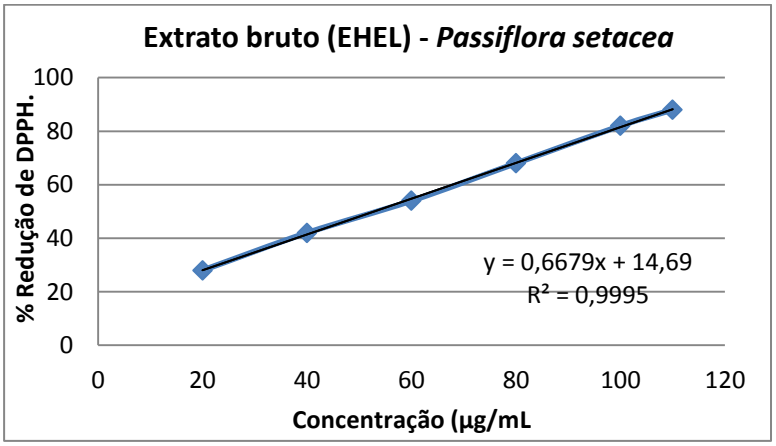


Figura 49. Curva de porcentagem de redução do DPPH• radical referente à concentração da fração aquosa de *Passiflora setacea*.

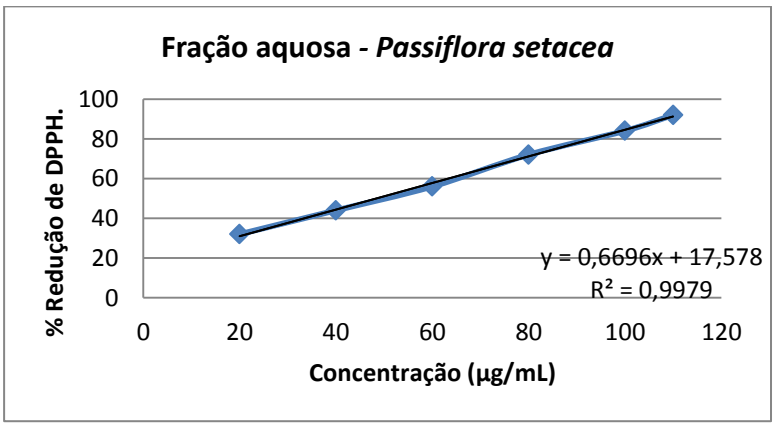


Tabela 7 - Concentração efetiva (CE_{50}) do extrato bruto e da fração aquosa de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* obtidas no ensaio de determinação de atividade antioxidante com DPPH• radicalar.

Amostras	CE_{50} (µg/mL) ± erro padrão
Trolox®	35 ± 2
Passiflora edulis – extrato bruto (EHEL)	74 ± 2
Passiflora edulis – fração aquosa	75 ± 3
Passiflora setacea – extrato bruto (EHEL)	53 ± 3
Passiflora setacea – fração aquosa	49 ± 3

6.11 Endotoxinas

A quantidade de endotoxinas foi analisada pelo Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários, Produtos Afins e as Respectivas Matérias-Primas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - CONFAR®, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Terezinha de Jesus Pinto, para o extrato bruto (EHEL) das duas *Passifloras*. A metodologia empregada foi Limulus Amebocyte Lysate (LAL). Na Tabela 8 estão apresentados os resultados em Unidade Endotóxica (UE) por mL, nanogramas por mL e UE por quilograma.

Tabela 8 – Quantidade de endotoxinas encontradas no extrato (EHEL das duas *Passifloras*, em UE por mililitro (UE/mL), nanogramas por mililitro (ng/mL) e UE por quilo.

Espécie vegetal	Quantidade de endotoxinas em UE/mL	Quantidade de endotoxinas em ng/mL	Quantidade de endotoxinas em UE/Kg
Passiflora edulis (EHEL – extrato bruto)	$2,26 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$6,7 \times 10^4$
Passiflora setacea (EHEL – extrato bruto)	$2,19 \times 10^5$	$1,46 \times 10^4$	$6,8 \times 10^4$

Limite para endotoxinas de acordo com o FDA (United States Food and Drug Administration) é 5 UE/Kg, que é a dose máxima que um ser humano pode receber por via endovenosa sem apresentar resposta imune. (US FDA, 1985).

6.12 Ensaios biológicos

6.12.1 Cultura celular

Os pellets das células foram divididos em dois grupos para análise de integridade de membrana e fragmentação de ADN empregando o citômetro de fluxo.

6.12.1.1 Integridade de membrana e fragmentação de ADN

Os resultados indicaram que até a concentração de 10 mg/mL das frações aquosas dos EHEL das duas Passifloras estudadas não houve morte celular significativa pois as porcentagens de células com membrana integra (M1 no quadro para integridade de membrana na figura 50) e com ADN integro (M2 no quadro na figura 50 referente à ADN integro) observados para estas concentrações foram muito próximas das concentrações do controle (sem adição dos extratos de Passifloras). Só houve diferença significativa ($p<0,05$) quando a concentração das duas Passifloras foi de 20 mg/mL.

Figura 50. Gráficos de pontos (dot plots) e histogramas representativos obtidos no citômetro de fluxo para integridade de membrana e fragmentação de ADN para diferentes concentrações da fração aquosa dos extratos EHEL de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*.

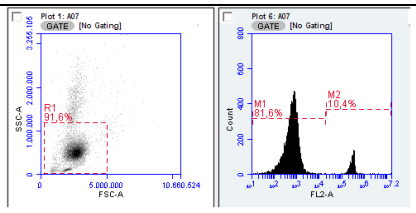
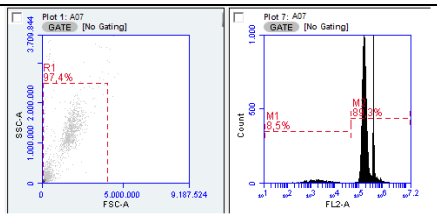
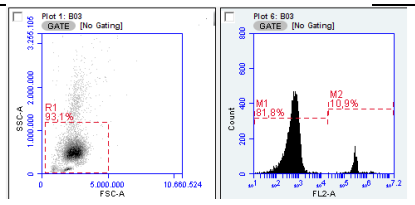
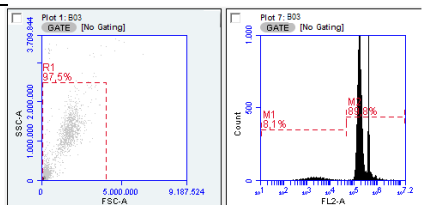
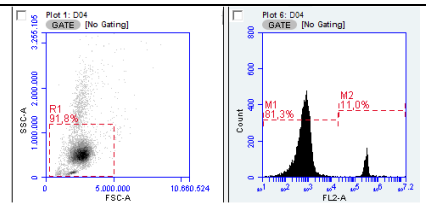
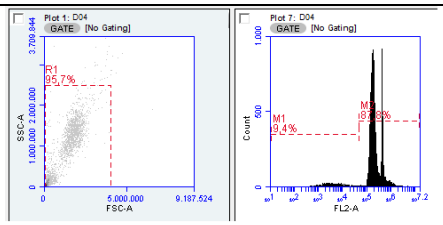
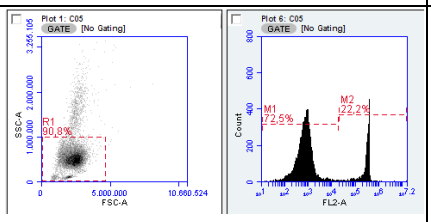
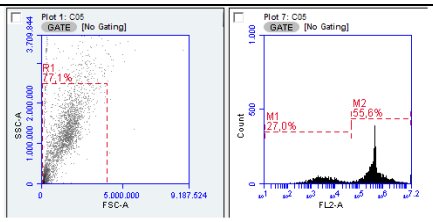
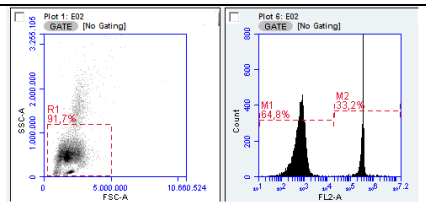
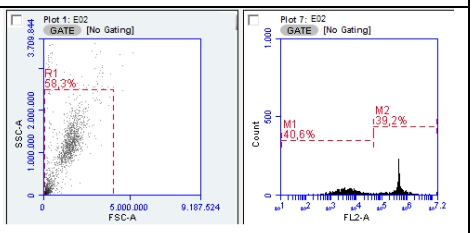
Concentração das frações aquosas do extrato EHEL (mg/mL)	Integridade de membrana	Fragmentação de ADN
Controle (-)	 M1 = membrana integra	 M2 = ADN integro
Passiflora edulis – 0,1; 1,0 e 10 mg/mL		
Passiflora setacea - 0,1; 1,0 e 10 mg/mL		
Passiflora edulis – 20 mg/mL		
Passiflora setacea – 20 mg/mL		

Figura 51. Gráfico de barras para porcentagem de células com membrana integra referente à citotoxicidade de diferentes concentrações das frações aquosas de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* em neutrófilos de humanos, em relação à integridade da membrana celular. Legenda:

(-) – Controle negativo (meio RPMI + células)
E 0,1 – extrato aquoso de *Passiflora edulis* na concentração de 0,1 mg/mL
E 1,0 - extrato aquoso de *Passiflora edulis* na concentração de 1,0 mg/mL
E 10,0 - extrato aquoso de *Passiflora edulis* na concentração de 10,0 mg/mL
E 20,0 - extrato aquoso de *Passiflora edulis* na concentração de 20,0 mg/mL
S 0,1 – extrato aquoso de *Passiflora setacea* na concentração de 0,1 mg/mL
S 1,0 - extrato aquoso de *Passiflora setacea* na concentração de 1,0 mg/mL
S 10,0 - extrato aquoso de *Passiflora setacea* na concentração de 10,0 mg/mL
S 20,0 - extrato aquoso de *Passiflora setacea* na concentração de 20,0 mg/mL
(valores expressos como média ± erro padrão de 3 experimentos feitos em duplicata - # - representa comparação com o controle negativo – diferem significativamente - p<0,05 – ANOVA e Bonferroni)

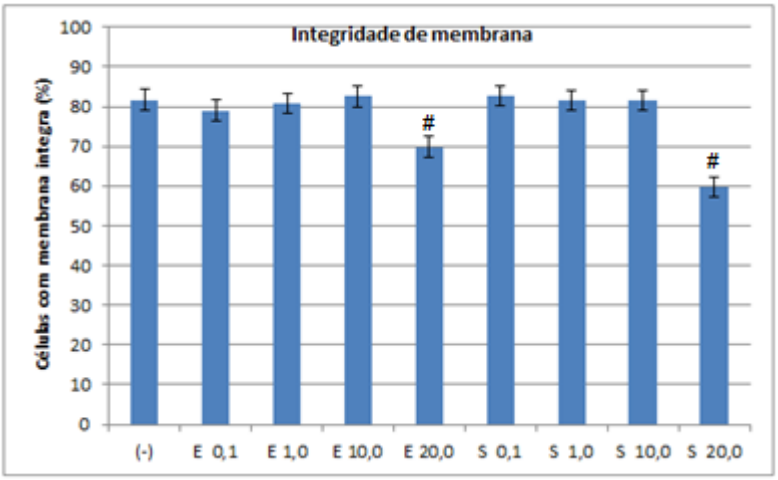
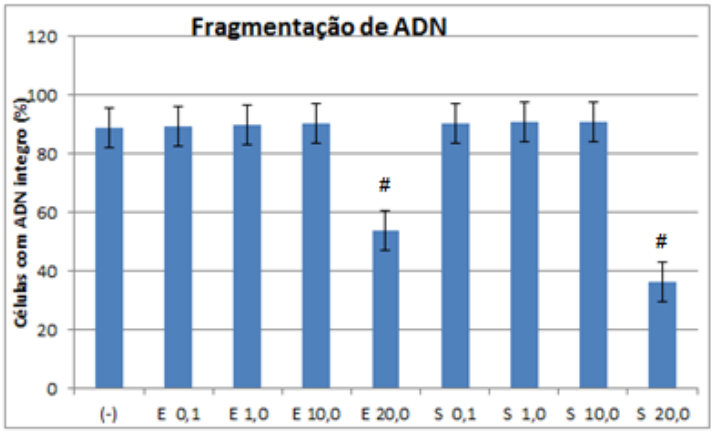


Figura 52. Gráfico de barras para porcentagem de células com ADN integro referente à citotoxicidade de diferentes concentrações das frações aquosas de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* em neutrófilos de humanos, em relação à fragmentação de ADN. Legenda:

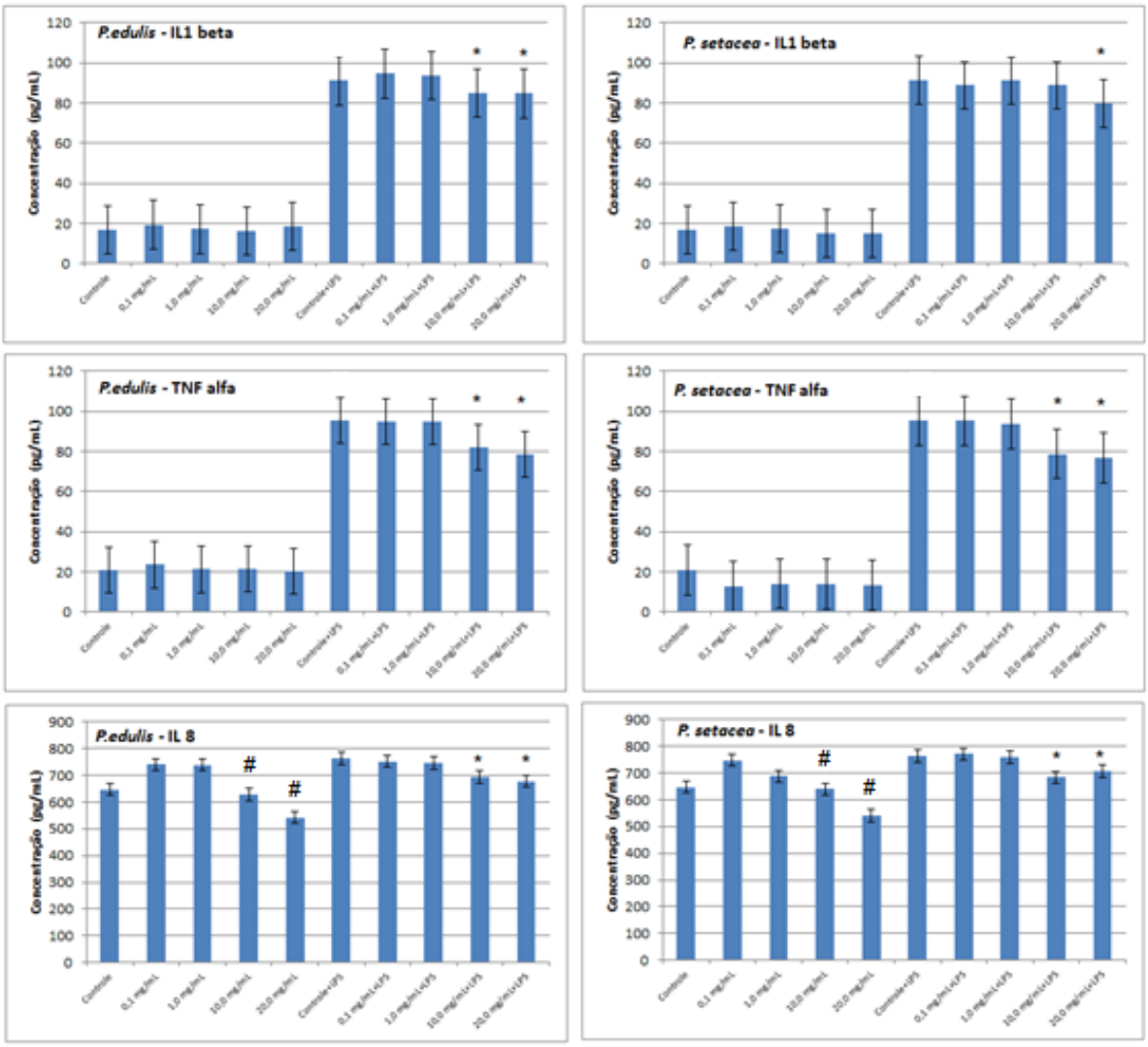
(-) – Controle negativo (meio RPMI + células)
E 0,1 – extrato aquoso de *Passiflora edulis* na concentração de 0,1 mg/mL
E 1,0 - extrato aquoso de *Passiflora edulis* na concentração de 1,0 mg/mL
E 10,0 - extrato aquoso de *Passiflora edulis* na concentração de 10,0 mg/mL
E 20,0 - extrato aquoso de *Passiflora edulis* na concentração de 20,0 mg/mL
S 0,1 – extrato aquoso de *Passiflora setacea* na concentração de 0,1 mg/mL
S 1,0 - extrato aquoso de *Passiflora setacea* na concentração de 1,0 mg/mL
S 10,0 - extrato aquoso de *Passiflora setacea* na concentração de 10,0 mg/mL
S 20,0 - extrato aquoso de *Passiflora setacea* na concentração de 20,0 mg/mL
(valores expressos como média ± erro padrão de 3 experimentos feitos em duplicata - # - representa comparação com o controle negativo – diferem significativamente - p<0,05 – ANOVA e Bonferroni)



6.12.1.2 Citocinas

Os sobrenadantes das culturas foram utilizados na analise de citocinas pelo método de ELISA, sendo os resultados registrados na figura 53:

Figura 53. Gráficos de liberação de citocinas (IL1- beta, TNF alfa e IL8) frente a diferentes concentrações dos extratos aquosos de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* em neutrófilos de humanos, com e sem LPS. (valores expressos como média ± erro padrão de 3 experimentos feitos em duplicata - * - representa comparação com o controle positivo e # - representa comparação com controle negativo – diferem significativamente p<0,05).



Não houve diferença significativa entre os grupos sem LPS no caso de IL-1-β e TNF-α. Houve diferença significativa (ANOVA, Bonferroni p< 0,05) entre os grupos sem LPS no caso de IL-8 e em todos os grupos com LPS onde as Passifloras foram empregadas em concentrações de 10 e 20 mg/mL.

6.12.2 Ensaio de ferida no dorso de ratos

A figura 55 apresenta as fotografias dos resultados obtidos no ensaio de cicatrização com o modelo de ferida. O tempo final do ensaio foi considerado de 11 dias, uma vez que todas as feridas fecharam dentro deste prazo. É possível observar ainda que entre o inicio (dia 0) e o 6º dia os grupos tratados com a fração aquosa das duas Passifloras em gel de carbopol® obtiveram uma aceleração da cicatrização justamente na passagem da fase inflamatória para a de granulação, sendo este efeito mais evidente no oitavo dia (fase de remodelamento). No 8º dia houve uma redução de aproximadamente 75 % da ferida inicial quando do uso das frações aquosas das Passifloras em gel de carbopol®, quando comparado ao grupo controle (só de gel de carbopol®) que permaneceu com 47 % da ferida aberta até este dia.

Figura 54. Média das áreas das feridas para o controle (Carbopol®) e as duas Passifloras nos períodos inflamatórios, de granulação e de remodelamento. (n=8 animais em cada grupo).

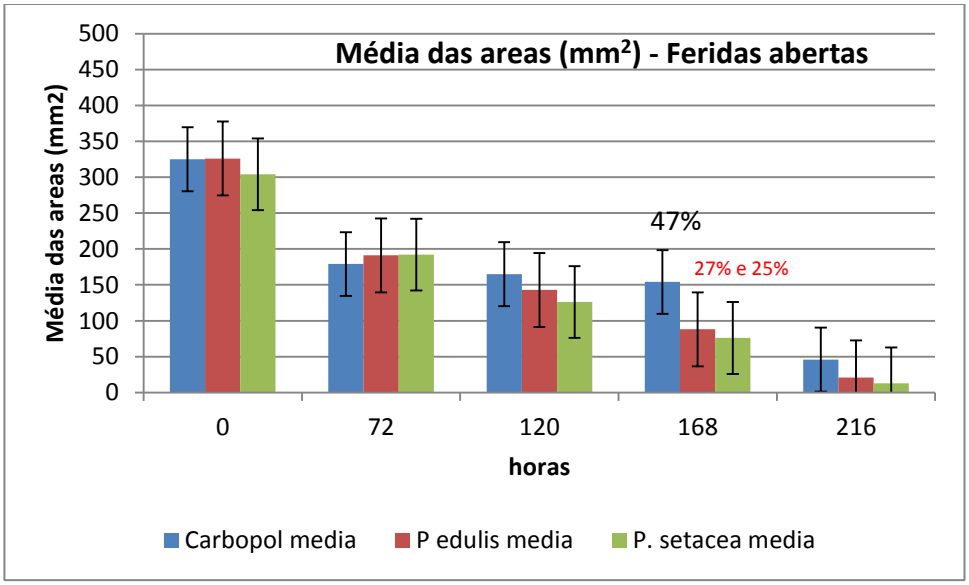


Figura 55. Fotos das feridas dos grupos controle negativo (gel de carbopol®) e frações aquosas das duas Passifloras incorporadas no gel de carbopol® a 1% nos dias 0, 4 e 8, correspondendo ao inicio da ferida, fase de granulação e remodelamento, respectivamente (n= 8 animais em cada grupo).

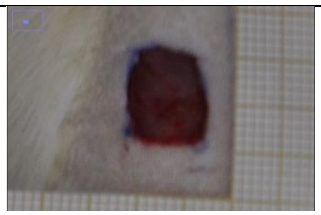
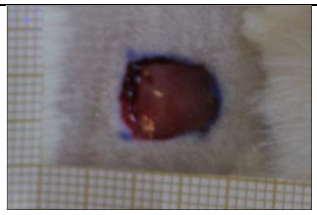
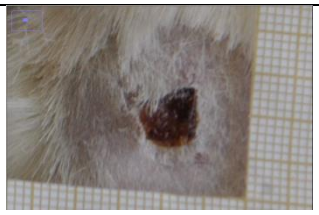
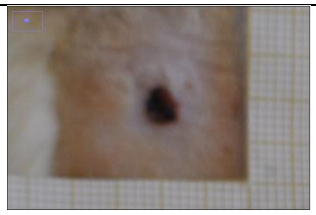
Dias de tratamento	0	4	8
Controle negativo (gel carbopol®)			
Fração aquosa de *Passiflora edulis* (1%) em gel de carbopol®			
Fração aquosa de *Passiflora setacea* (1%) em gel de carbopol®			

Figura 56. Áreas integradas das feridas abertas nos períodos inflamatório, de granulação e de remodelamento para o controle e as frações aquosas das duas Passifloras (n= 8 animais em cada grupo).

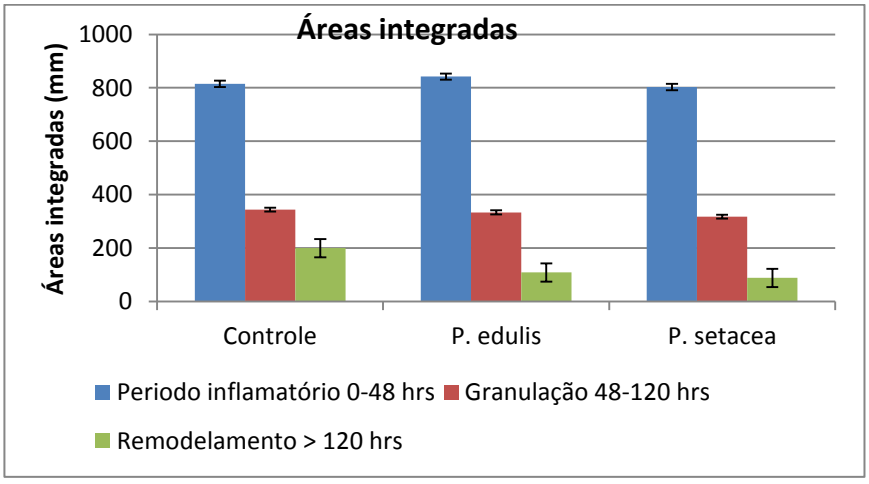


Figura 57. Velocidade de cicatrização dos grupos controle negativo (gel de carbopol®) e frações aquosas das duas Passifloras incorporadas no gel de carbopol® a 1%. (n= 8 animais em cada grupo).

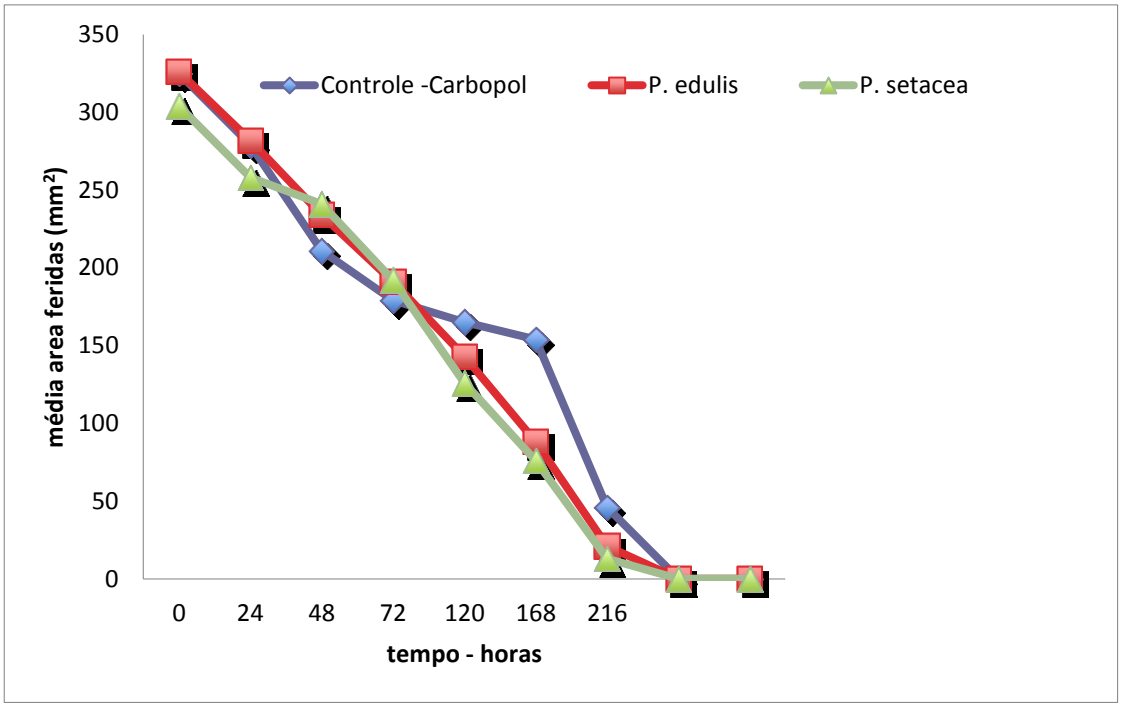
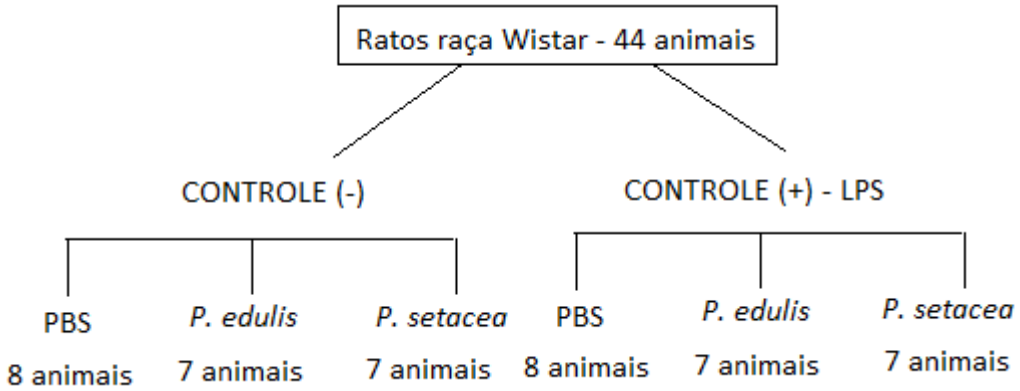


Tabela 9 - Atividade cicatrizante de Passifloras em feridas abertas em ratos (resultados = média de áreas ± desvios padrões de 8 animais em cada grupo)

Área da ferida (mm^2)	**Carbopol®**	***Passiflora edulis***	***Passiflora setacea***
Dia 0	325±58	326±73	304±27
Dia 4	179±41	191±41	192±37
Dia 8	154±37	88±39	76±37
Dia 11	46±2	21±12	13±8

6.12.3 Ensaio de migração de neutrófilos em bolsa de ar estéril

O ensaio foi realizado com 44 ratos machos da raça Wistar (nascimento: 01/08/2013 – recebidos: 18/09/2013 – inicio experimento: 19/09/2013 – peso: 178-180 g – 50 dias) divididos em 6 grupos:



Distribuídos da seguinte forma:

- 1 mL de PBS para controle negativo,
- 1 mL de extrato EHEL de *Passiflora edulis* dissolvido em PBS estéril contendo 10 mg/mL (dose não letal para neutrófilos testada em ensaio de fragmentação de ADN e de viabilidade celular) o que corresponde a uma dose de 56 mg/Kg,
- 1 mL de extrato EHEL de *Passiflora setacea* dissolvido em PBS estéril contendo 10 mg/mL (dose não letal para neutrófilos testada em ensaio de fragmentação de ADN e de viabilidade celular) o que corresponde a uma dose de 56 mg/Kg,
- 1 mL de PBS estéril contendo o estímulo positivo LPS (controle positivo – 5 µg de LPS/mL).
- 1 mL de extrato EHEL de *Passiflora edulis* dissolvido em PBS estéril contendo 10 mg/mL (dose não letal para neutrófilos testada em ensaio de fragmentação de ADN e de viabilidade celular) mais o LPS (5 µg/mL).
- 1 mL de extrato EHEL de *Passiflora setacea* dissolvido em PBS estéril contendo 10 mg/mL (dose não letal para neutrófilos testada em ensaio de fragmentação de ADN e de viabilidade celular) mais o LPS (5 µg/mL).

Após uma semana da aplicação da bolsa de ar no dorso dos animais, estes foram inoculados conforme descrito acima e após 4 horas os animais foram sacrificados e

as bolsas foram lavadas com 2 mL de PBS estéril. O sobrenadante foi usado para análise de citocinas e as células foram contadas em Citômetro de fluxo.

6.12.3.1 Células

Este experimento, realizado empregando as frações aquosas dos extratos EHEL de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*, demonstrou para:

- *P. edulis* - uma migração de células semelhantes ao grupo de controle negativo (PBS). Quando adicionado o LPS a migração de células foi menor que a do controle positivo (só LPS).

- *P. setacea* - uma maior migração de células na bolsa no grupo tratado com os extratos em relação ao grupo controle negativo (PBS), mas muito próximas do controle positivo (LPS) quando este foi adicionado ao extrato.

A contagem de células foi feita em Citômetro de fluxo.

Figura 58. Boxplot - Contagem de neutrófilos em Citômetro de fluxo, relacionando a quantidade de neutrofilos encontrados no exsudato inflamatório e o tipo de tratamento utilizado. Os dados são provenientes de contagem de células em 7 animais por grupo.

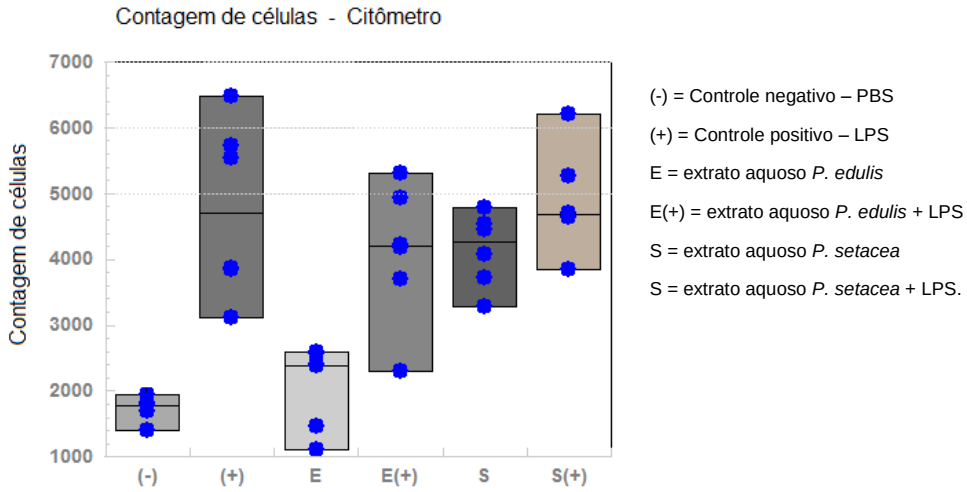
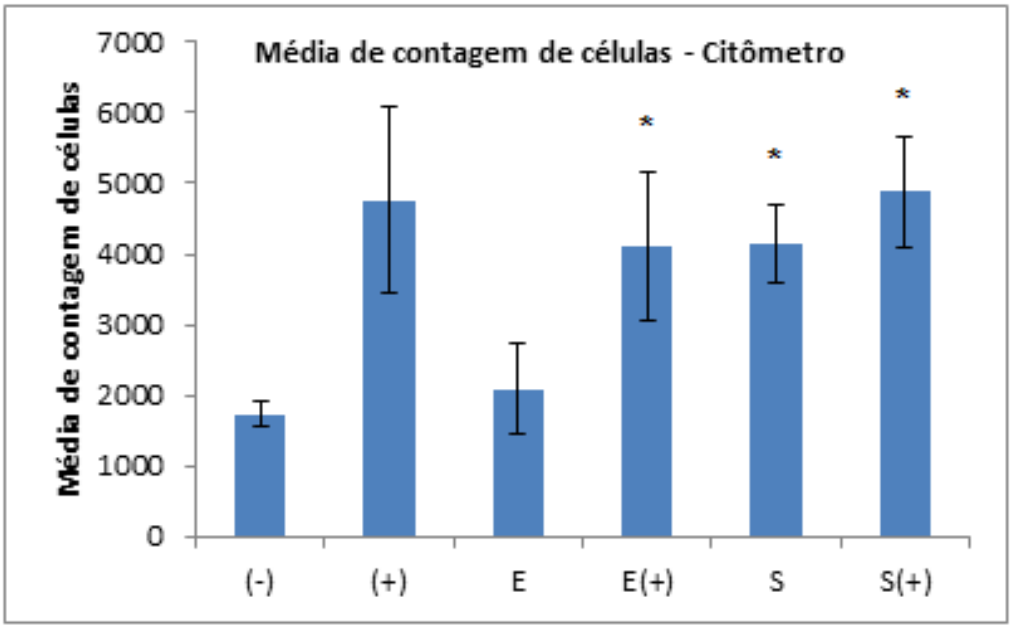


Figura 59. Média da contagem de células em Citômetro com os respectivos erros. Mesmo experimento anterior, n = 7 animais em cada grupo - * - representa comparação com controle positivo – não houve diferença significativa – p<0,05.



Legenda:

(-) = Controle negativo – PBS

(+) = Controle positivo – LPS

E = extrato aquoso *P. edulis*

E(+) = extrato aquoso *P. edulis* + LPS

S = extrato aquoso *P. setacea*

S = extrato aquoso *P. setacea* + LPS.

Na contagem de células com o citômetro de fluxo, não foram observadas diferenças significativas entre o controle positivo (+) e os grupos E(+), S, e S(+), pelo teste ANOVA e aplicação de Bonferroni (p<0,05).

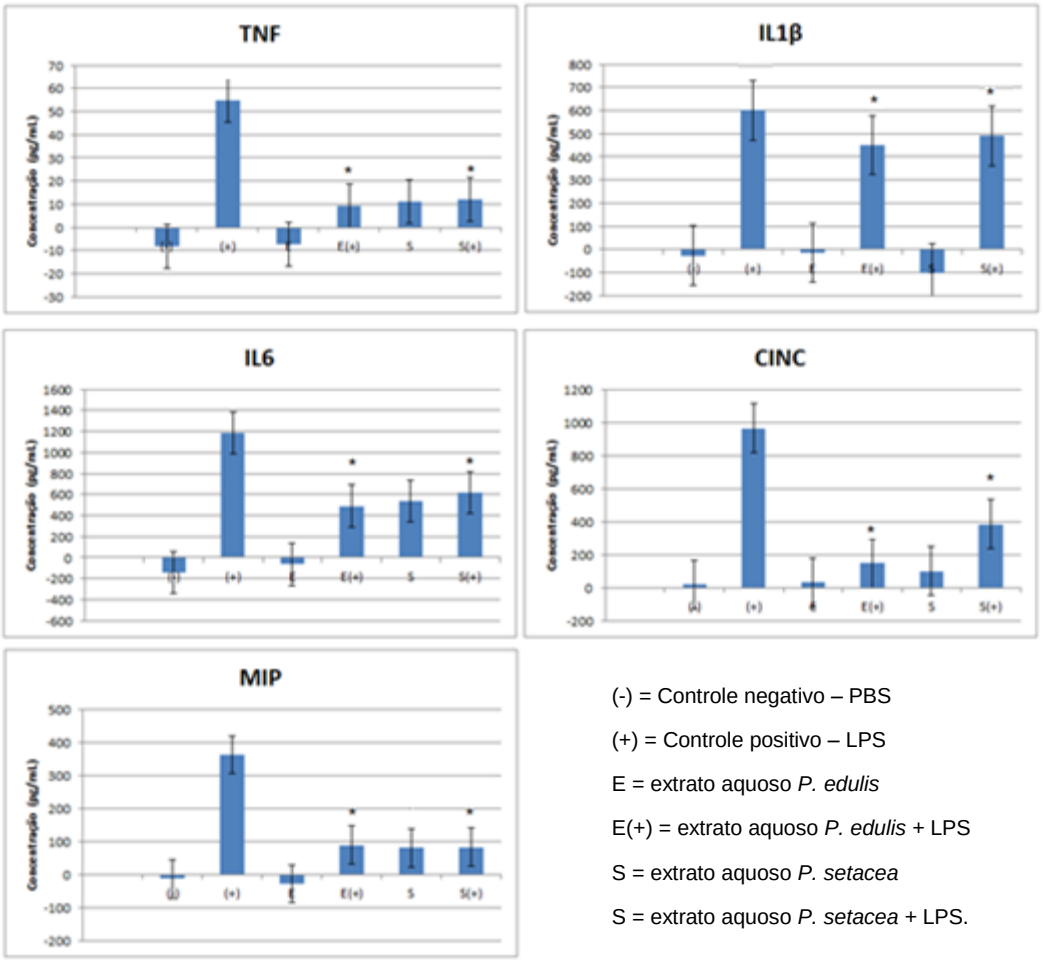
Neste experimento observamos a presença de células necrosadas quando do uso da fração aquosa de *Passiflora setacea* concomitantemente com o estimulo positivo LPS (S(+)).

6.12.3.2 Citocinas

O sobrenadante da lavagem das bolsas de ar dos animais tratados com as frações aquosas dos extratos de *P. edulis* e *P. setacea*, foram analisados com relação à produção de citocinas, tais como CINC, MIP, IL-6, IL-1β e TNF-α, as quais foram quantificadas por ELISA conforme descrito na metodologia, e os resultados estão apresentados na Figura 61.

Pode-se perceber que a administração das frações aquosas de *P. edulis* e *P. setacea* juntamente com um estímulo inflamatório exerce uma redução da resposta inflamatória em comparação à administração do estimulo inflamatório (LPS) isoladamente.

Figura 61. Comparação entre a liberação das citocinas mediante a aplicação de um dos 6 tratamentos (PBS, extrato aquoso das duas espécies de Passifloras, LPS, LPS + extrato aquoso das duas espécies de Passifloras). (valores expressos como média ± erro padrão - * - representa comparação com o controle positivo – diferem significativamente – p<0,05)



Discussão

7. Discussão

As amostras de plantas de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* que fazem parte do projeto Rede Passitec – Desenvolvimento tecnológico para uso funcional das passifloras silvestres, da EMBRAPA CERRADOS – apresentaram diferenças macro e microscópicas que permitem diferenciar as espécies, ou seja, os caracteres morfoanatomicos apresentados neste trabalho para *Passiflora setacea* irão contribuir para sua morfodiagnose e principalmente para sua distinção da Passiflora oficial brasileira, *Passiflora edulis*.

A folha e o caule de *Passiflora setacea* apresentaram vários pontos corados em tons que variaram de amarelo claro ate o laranja-amarronzado o que não ocorreu na *Passiflora edulis*. Para tentar determinar a natureza deste material empregamos reação com o cloreto férrico, o que tornou estes pontos corados em verde escuro, o que é característico de compostos fenólicos, para este reagente (PROENÇA DA CUNHA, 2009). A dissociação do material vegetal das duas espécies evidenciou a presença de grande numero de drusas de oxalato de cálcio e raros cristais prismáticos, o que é característico das Passifloraceae.

A triagem fotoquímica também demonstrou a presença de compostos fenólicos, tais como flavonoides e taninos e ausência de alcaloides, cumarinas e saponinas, nas duas espécies, *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*.

As analises por CCD, confirmaram a presença de flavonoides e taninos e também demonstram alguma diferença de composição entre estas duas espécies vegetais, principalmente para os flavonoides, sendo possível diferencia-las empregando esta técnica. Isto foi confirmado com as analises de CLAE/DAD/MS, sendo possível identificar os principais flavonoides presentes em *Passiflora edulis e Passiflora setacea*. No caso de *Passiflora edulis* a presença de derivados glicosilados de apigenina e luteolina, tais como orientina (luteolina-8-C-glicosideo – $C_{21}H_{20}O_{11}$), isoorientina, vitexina (apigenina-8-C-glicosideo – $C_{21}H_{20}O_{10}$) e isovitexina é comumente reportada (ABOURASHED et al, 2002;

DHAWAN et al, 2004) e estes foram confirmados pelos resultados obtidos nas análises efetuadas.

Pela literatura (ANDERSEN e MARKHAM, 2006) sabemos que os flavonoides têm espectros de massas característicos, com quebras tipo retro Diels-Alder, conforme mostrado nas figuras 62 e 63.

Figura 62. Estrutura e caminho de fragmentação para os 8-C-glicosideos orientina (R=OH) e vitexina (R=H), de acordo com a nomenclatura adotada por DOMON e COSTELO (1988), LI e CLAYES, (1994), e Ma et al (1997). Os sobrescritos representam as ligações que foram quebradas. (PEREIRA et al, 2005)

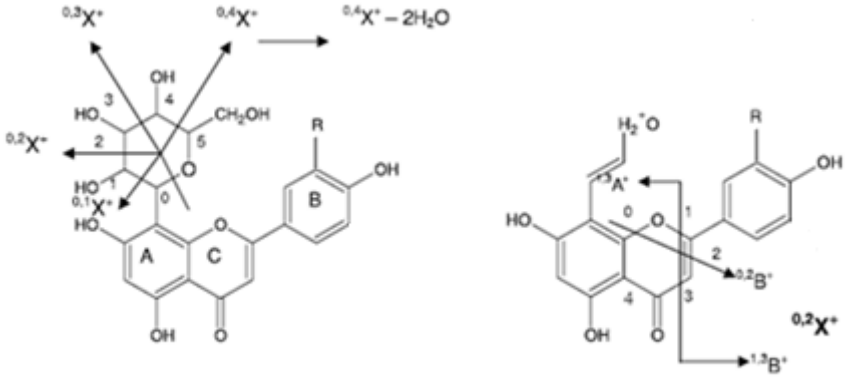
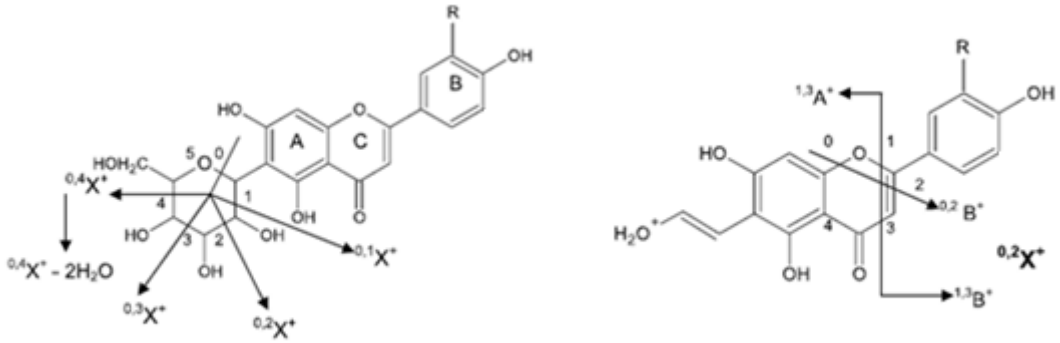


Figura 63. Estrutura e caminho de fragmentação para os 6-C-glicosideos isoorientina (R=OH) e isovitexina (R=H), de acordo com a nomenclatura adotada por DOMON e COSTELO (1988), LI e CLAYES, (1994), e Ma et al (1997). Os sobrescritos representam as ligações que foram quebradas. (PEREIRA et al, 2005)



Podemos esperar, portanto as seguintes fragmentações, de acordo com Colombo et al (2008) para as C-glicosilflavonas, vitexina e orientina presentes em Passifloras:

Tabela 10 – Íons de C-glicosilflavonas encontrados em extratos de Passifloras obtidos em fragmentações MS/MS a 65 V – equipamento Esquire 3000 Plus – Bruker (COLOMBO et al, 2008).

Composto	*m/z*	Ions (abundancia normalizada %)
Vitexina	433.1152	$[M+H]^+$ (18)
	415.1029	$[M+H-18]^+$: - H_2O (16)
	397.0925	$[M+H-36]^+$: -2 H_2O (26)
	379.0810	$[M+H-54]^+$: -3 H_2O (10)
Isovitexina	337.0913	$[M+H-96]^+$: $^{0,4}X^+$-2 H_2O (12)
	314.0740	$[M+H-120]^+$+H: $^{0,2}X^+$+H (18)
	313.0711	$[M+H-120]^+$: $^{0,2}X^+$ (100)
	284.0877	$^{0,2}X^+$- CHO (14)
	283.0617	$[M+H-150]^+$: $^{0,1}X^+$ (28)
Orientina	449.1085	$[M+H]^+$ (26)
	431.1012	$[M+H-18]^+$: -H_2O (16)
	413.0879	$[M+H-36]^+$: -2 H_2O (24)
	395.1023	$[M+H-54]^+$: -3 H_2O (9)
Isoorientina	353.0919	$[M+H-96]^+$: $^{0,4}X^+$-2 H_2O (10)
	330.0721	$[M+H-120]^+$+H: $^{0,2}X^+$+H (16)
	329.0638	$[M+H-120]^+$: $^{0,2}X^+$ (100)
	300.0614	$^{0,2}X^+$- CHO (24)
	299.0519	$[M+H-150]^+$: $^{0,1}X^+$ (10)

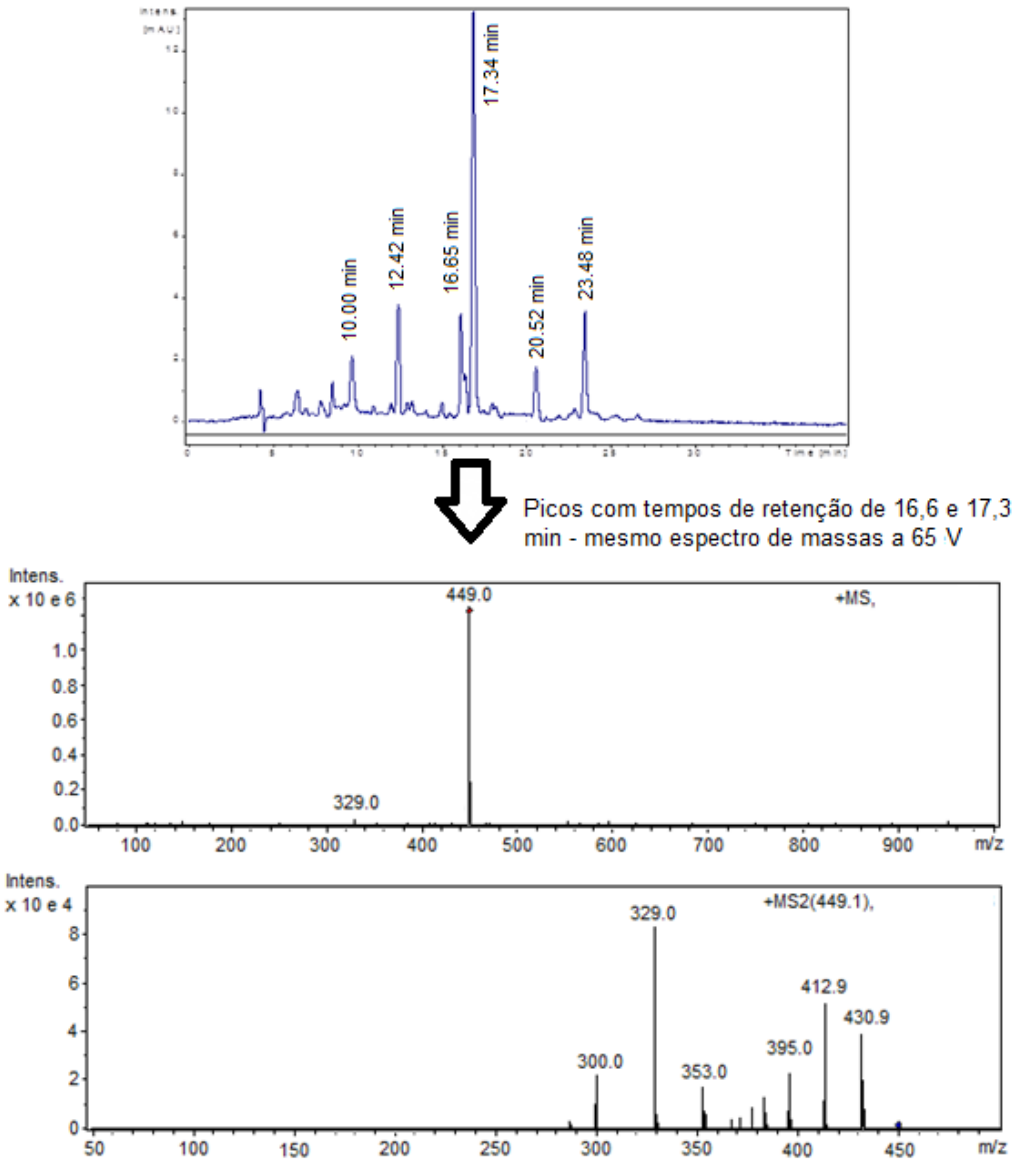
Nomenclatura segundo Domon e Costello (1988)

Orientina e isoorientina são isômeros com formula empírica $C_{21}H_{20}O_{11}$ e massa exata do íon molecular protonado de 449,1084. Como as estruturas destes dois compostos variam somente pela posição de ligação da glicose, sua diferenciação pelo padrão de fragmentação do espectro de massas representa um desafio (PEREIRA et al, 2005).

O espectro de massas de orientina e isoorientina a 65 V mostra que os principais fragmentos, para ambos os compostos foram obtidos a m/z 299,2 (($C_{16}H_{11}O_6$,

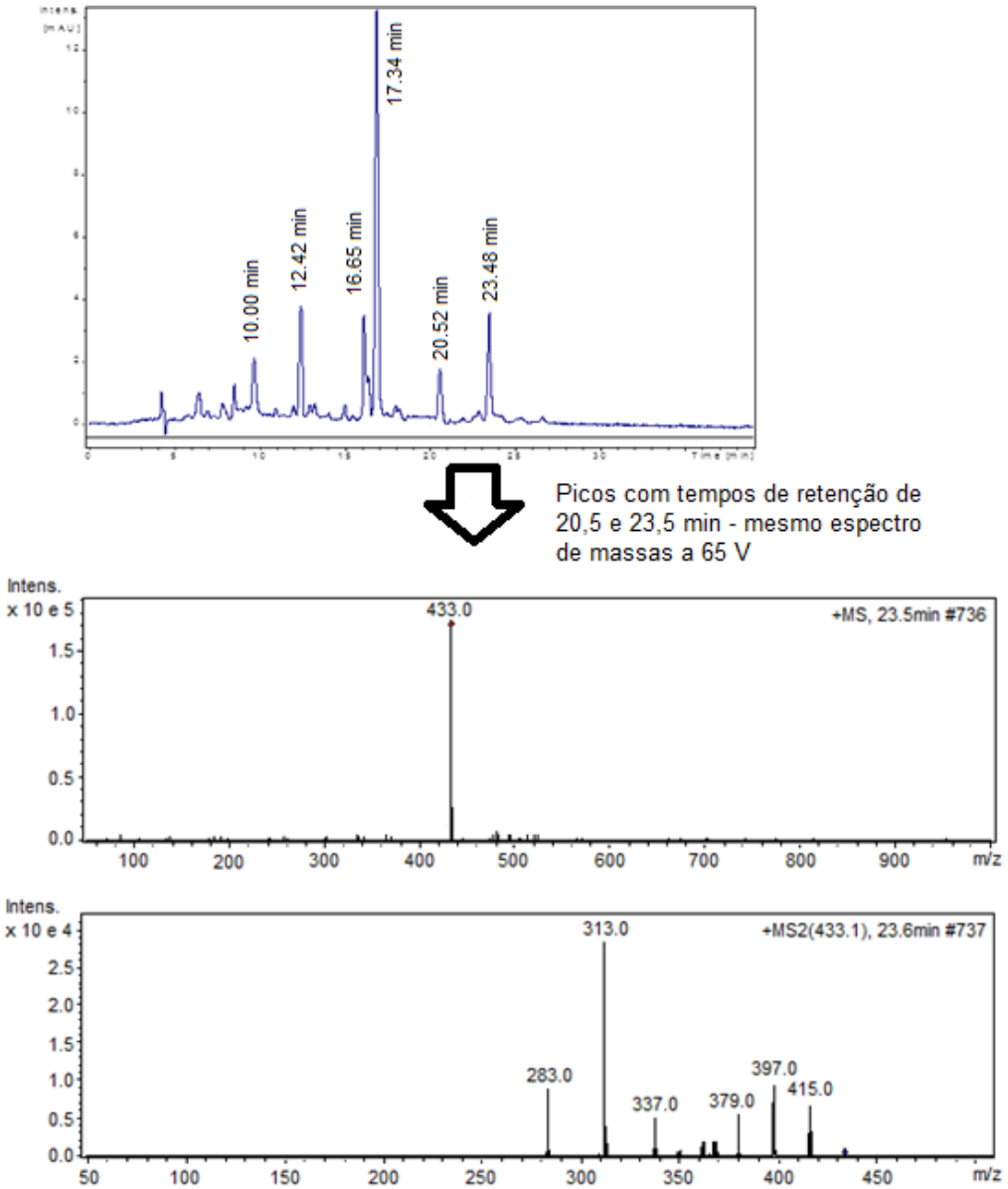
correspondente a $[M+H-150]^+$), m/z 329,0 ($C_{17}H_{13}O_7$, correspondente a $[M+H-120]^+$ - pico base), sendo este o íon diagnostico para flavonoides C-glicosilados (PRASAIN et al, 2004) e m/z 449,0 ($C_{21}H_{20}O_{11}$ correspondente ao íon pseudo-molecular). Os fragmentos com m/z 430,9 (correspondente a $[M+H-18]^+$), m/z 412,9 (correspondente a $[M+H-36]^+$) e m/z 395,0 (correspondente a $[M+H-54]^+$) são devidos a perda de moléculas de agua. Os dois picos obtidos no CLAE com tempo de retenção de 16,6 e 17,3 minutos apresentaram estes fragmentos.

Figura 64. Cromatograma obtido na CLAE de *Passiflora edulis* e espectro de massas correspondente aos picos com tempo de retenção de 16,6 e 17,3 minutos.



Vitexina e isovitexina também são isômeros e os dois picos observados em 20,5 e 23,5 minutos apresentaram espectros de massas compatíveis com estes compostos, tendo o pico base m/z 313,0, correspondente a quebra $^{0,2}X^{+}$ ($[M+H-120]^{+}$. O pico do íon pseudo-molecular $[M+H]^{+}$ tem m/z de 433,0. Os demais fragmentos para vitexina/isovitexina estão descritos na tabela 10. Os dois picos obtidos no CLAE dos EHEL e fração aquosa da *Passiflora edulis* têm tempo de retenção de 20,5 e 23,5 minutos e apresentaram estes fragmentos.

Figura 65. Cromatograma obtido na CLAE de *Passiflora edulis* e espectro de massas correspondente aos picos com tempo de retenção de 20,5 e 23,5 minutos.



Andersen e Markham (2006), além de Pereira et al (2005) demonstraram que quando procedemos a sequências de MS/MS com voltagens crescentes somente isoorientina e isovitexina, os 6 C-isômeros, produzem íons filhos a partir do íon pai de m/z $[M+H- 120]^+$, por retro Diels-Alder, os quais podem ser empregados para identificar estes dois compostos. Como no nosso caso possuíamos os padrões de vitexina e orientina, estes foram injetados no sistema de CLAE e identificados empregando os tempos de retenção como fator de exclusão, pois a CLAE, nas condições empregadas neste trabalho, possui a capacidade de separar os isômeros destes compostos.

Com os resultados obtidos podemos identificar os seguintes picos em *Passiflora edulis* na Tabela 11:

Tabela 11 – Identificação de picos obtidos na CLAE de *Passiflora edulis*

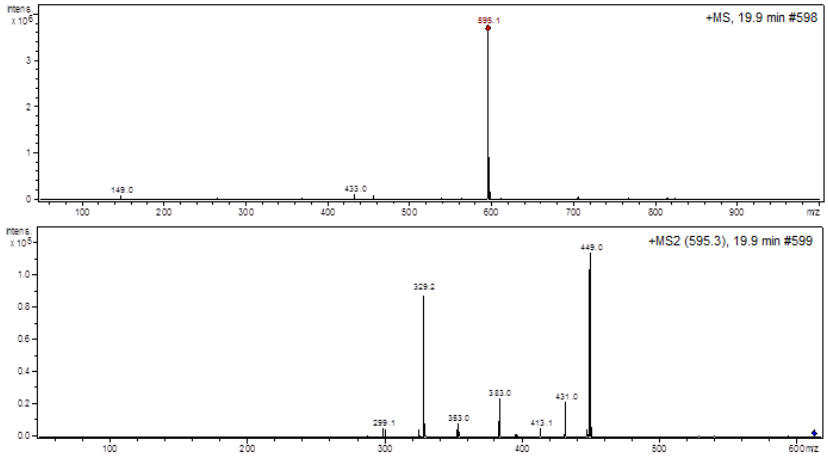
Tempo de retenção (min) no CLAE	Composto	Íon pseudomolecular $[M+H]^+$	Referências
16,6 min	Isoorientina	449	ANDERSEN e MARKHAM, (2006), DOMON e COSTELLO, (1988), PEREIRA, et al (2005)
17,3 min	Orientina	449	ANDERSEN e MARKHAM, (2006), DOMON e COSTELLO, (1988), PEREIRA, et al (2005)
20,5 min	Isovitexina	433	ANDERSEN e MARKHAM, (2006), DOMON e COSTELLO, (1988), PEREIRA, et al (2005)
23,5 min	Vitexina	433	ANDERSEN e MARKHAM, (2006), DOMON e COSTELLO, (1988), PEREIRA, et al (2005)

Em *Passiflora setacea* foi possível identificar os mesmos flavonoides C-glicosilados presentes em *Passiflora edulis*, e esta ainda apresentou um pico majoritário em 19,90 minutos, pela analise de CLAE, com um espectro de massas diferente dos já

descritos, mas também compatível com flavonoide. Este componente foi separado por CLAE semi-preparativa para posterior identificação por Ressonância magnética nuclear (RMN). A determinação estrutural deste componente é importante para utilização como possível marcador da espécie, por ser o pico de maior concentração na amostra recebida.

Pelo espectro de massas observado para este pico de *Passiflora setacea* em 19,9 min, podemos encontrar na literatura (PEREIRA, et al, 2005, ANDERSEN e MARKHAM, 2006, MA et al, 2001 e COLOMBO, et al, 2008) a seguinte lista de fragmentos possíveis para a estrutura em questão, conforme mostrado na figura 66:

Figura 66 – Espectro de massas obtido para o pico observado a 19,9 min no EHEL e fração aquosa de *Passiflora setacea* e possíveis fragmentos. Equipamento MS Bruker – Esquire 3000 Plus – Ion trap - 65 V – modo positivo - ESI.

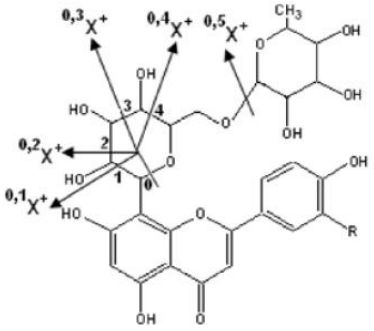


Composto	*m/z*	Ions (abundância relativa %)
Luteolina-8-C-raminosil glicosideo	595.1677	$[M+H]^+$ (16)
	449.1042	$[M+H-146]^+$: $^{0,5}X^+$ (100)
	431.1003	$[M+H-146-18]^+$: $-H_2O$ (29)
	413.0872	$[M+H-146-36]^+$: $-2\ H_2O$ (28)
	395.1009	$[M+H-146-54]^+$: $-3\ H_2O$ (12)
	353.0916	$[M+H-146-96]^+$: $^{0,4}X^+-2\ H_2O$ (22)
	330.0728	$[M+H-146-120]^+ + H$: $^{0,2}X^+ + H$ (15)
	329.0652	$[M+H-146-120]^+$: $^{0,2}X^+$ (77)
	300.0631	$^{0,2}X^+$- CHO (8)
	299.0570	$[M+H-146-150]^+$: $^{0,1}X^+$ (16)

Nomenclatura segundo Domon e Costello (1988)

Estes fragmentos podem ser devidos as seguintes quebras, conforme Colombo et al (2008), figura 67:

Figura 67. Quebras observadas para o composto obtido na CLAE de *Passiflora setacea* a 19,9 min. conforme Colombo et al, 2008.



O espectro de massas deste composto, que pode corresponder a luteolina-8-C-raminosil-glicosideo a 65 V mostra que os principais fragmentos foram obtidos a m/z 449 ($C_{21}H_{20}O_{11}$ correspondente a $[M+H-146]^+$), devido à perda de uma unidade de açúcar, que é o pico base, e a m/z 329,0 (correspondente a $[M+H-146-120]^+$), sendo este o íon diagnostico para flavonoides C-glicosilados (PRASAIN et al, 2004). Os fragmentos com m/z 431 (correspondente a $[M+H-146-18]^+$), m/z 413 (correspondente a $[M+H-146-36]^+$), m/z 395 (correspondente a $[M+H-146-54]^+$) e m/z 353 (correspondente a $[M+H-146-96]^+$) são devidos a perda de moléculas de agua. Observam-se também os picos a m/z 330 (correspondente a $[M+H-146-120]^+ + H$), a m/z 300 (correspondente a $[^{0,2}X]^+ - CHO$) e m/z 299 (correspondente a $[M+H-146-150]^+$). Estes fragmentos concordam com a estrutura da orientina retirando-se o açúcar a mais que está presente na luteolina-8-C-ramnosil-glicosideo.

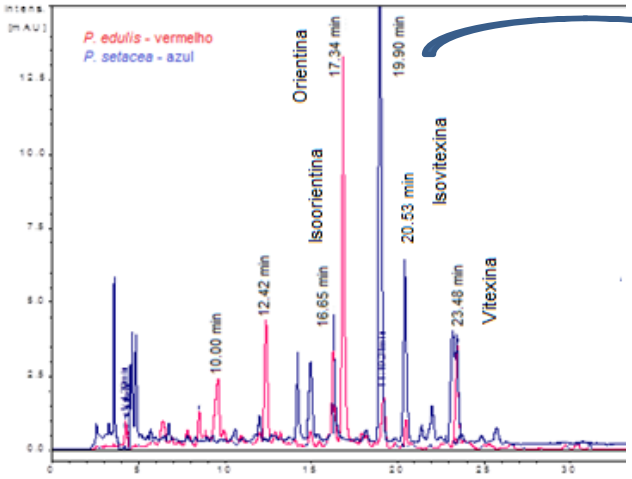
Associamos estes resultados com os espectros de RMN obtidos. O espectro de RMN H^1 (500 MHz, solvente = DMSO-d6) deste composto mostrou um singleto a δ 12,91 ppm, que é característico de 5-OH, além dos sinais δ 12,73 (C7-OH), δ 11,12 (C3'-OH) e δ 10,41 (C4'-OH). Este espectro também mostrou sinais a δ 7,34 (1H, dd, *J* = 2,0 e 8,0 Hz), δ 7,35 (1H, d, *J* = 2,0 Hz) e δ 6,88 (1H, d, *J* = 8,0 Hz) que correspondem a H-6', H-2' e H-5'

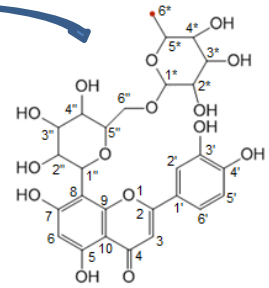
respectivamente. Um dupleto a δ 6,36 (1H, d, *J* = 2,0 Hz) é atribuído ao H-6 do anel A. Não há sinal de hidrogênio no C8 onde se liga um dos açucares. Um singleto em δ 6,56 (1H, s) é atribuído ao H-3, típico de um derivado de luteolina (ZHOU et al, 2005). Um dupleto a δ 5,2 (1H, d, *J* = 9,5 Hz – H-1") e um singleto a δ 5,38 (1H, s – H-1*) no espectro de RMN de H^1 revelam a presença de dois hidrogênios anoméricos de dois açucares. Os sinais de hidrogênios observados de δ 3,2-3,7 são devidos aos hidrogênios dos açucares. Observa-se um sinal em δ 1,10, característico de –CH3 (hidrogênios metílicos).

O espectro de C^{13} (125 MHz, solvente = DMSO-d6) apresentou 27 sinais dos quais 15 foram atribuídos à aglicona, e 12 sinais atribuídos às duas unidades de açúcar. Foram observados os seguintes sinais: δ (ppm): 164,4 (C-2), 103,2 (C-3), 181,7 (C-4), 161,2 (C-5), 99,1 (C-6), 162,4 (C-7), 104,7 (C-8), 156,9 (C-9), 105,4 (C-10), 121,6 (C-1'), 113,4 (C-2'), 146,3 (C-3'), 150,0 (C-4'), 115,9 (C-5'), 119, 1 (C-6'), que correspondem à estrutura da aglicona. Os sinais em δ: 73,4 (C-1''), 70,4 (C-2''), 76,7 (C-3''), 69,8 (C-4"), 83,2 (C-5"), 69,5 (C-6''), correspondem à glicose e os sinais em δ 101,8 (C-1*), 80,9 (C-2*), 70,4 (C-3*), 72,6 (C-4*), 72,3 (C-5*), 17,5 (C-6*) são atribuídos à ramnose, sendo o sinal em δ 17,5 característico de –CH3.

Levando em consideração os resultados obtidos com o espectro de massas e de RMN de H^1 e C^{13} identificamos a estrutura da luteolina-8-C-ramnosil-glicosídeo como sendo o composto que foi observado a 19,9 min na CLAE da *Passiflora setacea*. Portanto na figura 68 temos a identificação dos picos majoritários encontrados nas duas Passifloras.

Figura 68. Identificação dos picos majoritários encontrados nas duas Passifloras.





Luteolina-8-C-ramnosil-glicosideo

Este composto foi identificado por Colombo et al (2008) em extratos de cana de açúcar, onde foram encontrados também vitexina e orientina. No trabalho de Colombo et al, as identificações foram feitas empregando somente os espectros de massas.

A quantidade de flavonoides totais foi determinada nos extratos hidroetanólicos (EHEL) e nas frações aquosas das duas espécies. *Passiflora setacea* possui maior teor de flavonoides totais que *Passiflora edulis,* mas considerando-se os extratos EHEL e frações aquosas de cada *Passiflora*, a quantidade de flavonoides totais é muito próxima. Já nos extratos preparados com acetato de etila a quantidade de flavonoides foi menor do que a faixa empregada na curva de calibração. Isto é devido provavelmente a grande quantidade de flavonoides C-glicosilados existentes nas espécies estudadas e que não são solúveis em solventes pouco polares.

A atividade antioxidante em relação ao DPPH radicalar também demonstrou maior resultado para *Passiflora setacea* (CE_{50} cerca de 50 µg/mL) em relação à *Passiflora edulis* (CE_{50} cerca de 75 µg/mL), e os extratos EHEL e frações aquosas de cada *Passiflora* apresentaram resultados muito semelhantes.

Isto é interessante para as analises biológicas. As frações aquosas das duas espécies de Passifloras além de apresentarem quantidades próximas de flavonoides totais e

poder antioxidante muito semelhante aos EHELs, também têm vantagem com relação a não haver necessidade de utilização de solventes orgânicos para dissolução, que são irritantes potenciais.

Pesquisas recentes têm associado a presença destes flavonoides C-glicosilados a vários efeitos farmacológicos, como função ansiolítica e sedativa, além da ação anti-inflamatória (DE-PARIS et al., 2002; COLETA et al., 2006; SANTOS et al., 2006; SENA et al., 2009; ZUCOLOTTO et al., 2012), fazendo com que a analise destes constituintes seja proposta para autenticação de amostras ou para caracterizar espécies proximamente relacionadas (ABOURASHED et al., 2002).

Em relação à atividade anti-inflamatória, os flavonoides atuam modulando células envolvidas com a inflamação (por exemplo, inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF-α e IL-1-β), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A_2, ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (CAZAROLLI et al, 2008), o que torna muito importante a determinação destes compostos nas espécies estudadas.

Foram detectadas também endotoxinas nos extratos hidroetanólicos (EHEL) que apresentaram resultados bem maiores que o limite preconizado pelo FDA. O limite para endotoxinas de acordo com o FDA (Food and Drug Administration USA) é 5 UE/Kg, que é a dose máxima que um ser humano pode receber por via endovenosa sem apresentar resposta imune. No nosso caso estes extratos não serão aplicados por via endovenosa, mas as endotoxinas presentes certamente terão efeito no sistema imunológico dos animais. De forma geral, acreditamos que a manipulação de extratos vegetais de uso popular e preparo caseiro, carregue junto endotoxinas e que a maioria dos efeitos desses extratos observados até o momento podem ser uma somatória do efeito do extrato mais os contaminantes, como as endotoxinas.

Como já foi citado, para os ensaios biológicos empregamos somente as frações aquosas dos extratos hidroetanólicos das duas Passifloras, devido às vantagens que estes têm em relação aos EHELs e as frações acetato de etila, e iniciamos os testes biológicos empregando culturas celulares com neutrófilos extraídos de humanos, para verificar o nível de toxicidade dos extratos utilizados e determinar a dose que não causaria morte celular.

Existem poucos trabalhos sobre a toxicidade de Passifloras, mas Boeira et al (2010) fizeram um estudo para determinar a toxicidade aguda e subaguda e a genotoxicidade de um extrato aquoso de *Passiflora alata* que possuía 2,6 % de flavonoides totais. A toxicidade aguda e subaguda foi determinada em camundongos e ratos, respectivamente. Parâmetros de comportamento, bioquímicos, hematológicos e histológicos foram considerados. Genotoxicidade foi determinada usando teste de micronúcleos e leucócitos em sangue periférico e em células de medula óssea, dos animais. Não foi observada morte de camundongos pela ingestão de até 4800 mg/Kg, via oral, dose única. Ratos tratados com extrato aquoso de *Passiflora alata* na dose de 300 mg/Kg, por via oral, por 14 dias, não apresentaram alterações bioquímicas, hematológicas ou histopatológicas significativas quando comparados ao grupo controle (solução tampão). Contudo estes ratos apresentaram sinais de irritabilidade e não tiveram aumento de peso em relação ao grupo controle. Camundongos tratados com extrato aquoso por via oral na dose de 50 mg/Kg apresentaram degradação do ADN em testes no sangue periférico após 3 horas de tratamento. Neste trabalho, apesar das altas doses envolvidas para levar a alterações biológicas, a conclusão dos autores foi de que a *Passiflora alata* tem efeito genotóxico e que merece maiores exames toxicológicos.

No nosso caso iniciamos com testes em culturas de células de neutrófilos de humanos com emprego das frações aquosas dos extratos das duas espécies vegetais em varias concentrações (0,1; 1,0; 10,0; 20,0 mg/mL), com e sem LPS para verificar a produção de citocinas e determinar a citotoxicidade das frações aquosas dos extratos empregados. Os resultados de integridade de membrana e fragmentação de ADN mostraram que até a concentração de 10 mg/mL não houve morte celular causada pelas frações aquosas das

duas espécies de Passifloras. Observou-se também que quando o estimulo positivo era introduzido (presença de LPS), havia diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1-β, TNF-α e IL-8) quando as concentrações das frações aquosas das duas Passifloras eram iguais ou maiores que 10 mg/mL. Isto demonstra que concentrações de zero, 0,1 e 1,0 mg/mL não tiveram atividade anti-inflamatória, porem em concentrações iguais ou maiores de 10 mg/mL esta atividade já é observada. Devemos salientar que com 20 mg/mL a diminuição da produção de citocinas anti-inflamatórias pode ser devida à morte celular.

A concentração de 10 mg/mL foi empregada nos testes seguintes como ferida no dorso dos ratos e migração de neutrófilos em bolsa de ar estéril pois esta concentração não apresentou morte celular.

Os testes de ferida demonstraram uma vantagem quando do uso das frações aquosas dos extratos das duas Passifloras, com maior uniformidade de fechamento e melhor velocidade de cicatrização quando estas foram utilizadas. Verificou-se vantagem para o tratamento com as Passifloras já no período de remodelamento (após o sexto dia de tratamento). No oitavo dia de tratamento (168 horas) o grupo controle ainda apresentava 47 % da ferida aberta enquanto que os grupos com uso das frações aquosas dos extratos das Passifloras apresentaram somente cerca de 25 % da ferida ainda aberta. Não houve diferença significativa entre os grupos de Passifloras. Estes resultados estão de acordo com os resultados observados nos neutrófilos de humanos que evidenciaram a atividade anti-inflamatória destas duas espécies de Passifloras, já na concentração de 10 mg/mL (1%).

O teste de migração de neutrófilos em bolsa de ar estéril mostrou que houve diferença significativa ($p<0,05$) de liberação de citocinas no caso do estímulo positivo (LPS) e do estímulo negativo (PBS). *Passiflora edulis* não tem ação inflamatória quando é empregada isoladamente, pois apresentou respostas muito próximas do controle negativo, mas quando o estimulo positivo (LPS) é adicionado há diminuição de produção de citocinas pro-inflamatórias. *Passiflora setacea* pode apresentar pequena ação inflamatória quando administrada sozinha, mas no caso de uso concomitante com o estimulo do LPS, também a ação anti-inflamatória predomina. Isto demonstra mais uma vez a ação anti-inflamatória das

frações aquosas das duas Passifloras devido a inibição da liberação de citocinas pro-inflamatórias como TNF-α, IL-6, CINC e MIP.

Montanher et al (2007) investigaram o mecanismo do efeito anti-inflamatório do extrato aquoso liofilizado de folhas de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener em ratos com uso de carragenina (Cg), bradicinina, histamina ou substância P, e observaram os efeitos sobre a migração de leucócitos, liberação de mieloperoxidase (MPO), oxido nítrico (NO) e estudaram as concentrações de TNF-α e IL-1-β. Os resultados obtidos mostraram que o extrato aquoso liofilizado de *Passiflora edulis* na dose de 250 mg/Kg, administrado por via intraperitoneal inibiu os níveis de leucócitos, neutrófilos, mieloperoxidase, oxido nítrico, TNF-α e IL-1-β ($p<0,01$) na inflamação causada por bradicinina, histamina ou substância P ($p<0,05$). Vários mecanismos incluindo a inibição da liberação das citocinas pro-inflamatórias (TNF-α e IL-1-β), inibição de liberação de enzimas (mieloperoxidase) e mediadores (bradicinina, histamina, substância P, NO) parecem ser responsáveis pela ação anti-inflamatória da *Passiflora edulis*.

Neste trabalho determinamos que os compostos mais abundantes presentes nas duas Passifloras são derivados glicosilados da luteolina:

- *Passiflora edulis*: composto majoritário = orientina (luteolina-8-C-glicosideo)
- *Passiflora setacea*: composto majoritário = luteolina-8-C-ramnosil-glicosideo.

Estes compostos de luteolina são conhecidos por sua grande atividade anti-inflamatória (LOPEZ-LAZARO, 2009) *in vitro* e *in vivo.* Muitos mecanismos parecem estar envolvidos na atividade anti-inflamatória destes flavonoides. A ativação do fator NF Kappa-B nuclear (NF-kB) aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e enzimas (como por exemplo, TNF-α, IL-6, IL-1-β, IL-8) e vários trabalhos que foram inclusos na excelente revisão feita por Lopez-Lazaro (2009) têm mostrado que a luteolina e seus derivados glicosilados inibe a atividade do NF-kB mesmo em concentrações micromolares.

Xagorari et al (2001) identificaram a luteolina como o mais potente dos flavonoides testados (luteolina, derivado glicosilado de luteolina, quercetina, genisteina) na inibição da liberação de TNF-α em macrófagos e demonstraram que a luteolina bloqueia a

ativação induzida pelo LPS do fator NF-kB, bem como diminui a expressão do gene deste fator. O fator de transcrição AP-1 é uma proteína que pertence à família FOS e JUN a qual regula a expressão de genes em resposta a vários estímulos incluindo produção de citocinas, fatores de crescimento, stress e infecções bacterianas e virais. AP-1 participa da resposta inflamatória do organismo.

Jang et al (2008) verificaram que a expressão da citocina inflamatória IL-6 é mediada pela AP-1 juntamente com o NF-kB. Luteolina inibe a produção de IL-6 induzida por LPS *in vitro* e *in vivo*, pela inibição de AP-1.

Odontuya et al (2005) fizeram um estudo com a luteolina e seus derivados glicosilados e verificaram que a luteolina apresentou grande atividade contra a síntese tanto de tromboxano como de leucotrieno, que participam do processo inflamatório. Verificaram também que a luteolina e seus derivados glicosilados mostraram ótima atividade de reação com peróxido de hidrogênio em varias concentrações. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que as reatividades da luteolina e seus derivados glicosilados contra a síntese do acido aracdônico e reação com peroxido de hidrogênio são dependentes de suas estruturas moleculares. A presença de grupos orto-di-hidroxi no anel B, com uma dupla ligação na posição C2-C3 no anel C, uma função oxo na posição 4 e a presença de OH no carbono C-5 do anel A são requeridos para ótima inibição da liberação de TNF-α estimulada por LPS.

Devido a todos os resultados observados neste trabalho podemos concluir que estas duas espécies de Passifloras têm atividade cicatrizante e anti-inflamatória significativamente diversa dos sistemas empregados como controle e que podem constituir auxiliares importantes no preparo de futuros medicamentos para melhoria do processo de cicatrização.

Conclusões

8 . Conclusões

❖ Os caracteres morfoanatomicos apresentados neste trabalho para *Passiflora setacea* irão contribuir para sua morfodiagnose e principalmente para sua distinção da *Passiflora* oficial brasileira, *Passiflora edulis*.

❖ A triagem fitoquímica demonstrou a presença de compostos fenólicos, tais como flavonoides e taninos e ausência de alcaloides, cumarinas e saponinas, nas duas espécies, *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*, sendo possível a diferenciação das duas espécies por técnica de CCD.

❖ Foi possível identificar os principais componentes químicos presentes na *Passiflora edulis* como sendo orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina, com uso de separação por CLAE e identificação por técnicas de DAD e MS.

❖ Na *Passiflora setacea* foi identificado um pico majoritário que não foi encontrado na *Passiflora edulis,* Com uso de técnicas de CLAE semi-preparativa, espectroscopia de massas e ressonância magnética nuclear, este composto foi identificado como sendo luteolina-8-C-ramnosil-glicosideo.

❖ A *Passiflora setacea* apresentou maior teor de flavonoides totais (3,18 g em vitexina) que a *Passiflora edulis* (2,21 g em vitexina).

❖ A atividade antioxidante em relação ao DPPH radicalar também demonstrou maior resultado para a *Passiflora setacea* (CE_{50} = 50 µg/mL) em relação à *Passiflora edulis* (CE_{50} = 75 µg/mL).

❖ Foram detectadas também endotoxinas nos extratos hidroetanólicos (EHEL) que apresentaram resultados bem maiores (6,7 x 10^4 EU/Kg) que o limite preconizado pelo FDA (5 EU/Kg). A manipulação de extratos vegetais de uso popular e preparo caseiro deve carregar junto endotoxinas sendo que a maioria dos efeitos dos extratos pode ser uma somatória do efeito do extrato mais os contaminantes, como as endotoxinas.

❖ Os resultados de integridade de membrana e fragmentação de ADN mostraram que até a concentração de 10 mg/mL não houve morte celular causada pelas frações

aquosas das duas espécies de Passifloras e houve atividade anti-inflamatória, com diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1-β, TNF-α e IL-8).

❖ Os testes de ferida no dorso de ratos demonstraram uma vantagem quando do uso das frações aquosas das duas Passifloras, com maior uniformidade de fechamento e melhor velocidade de cicatrização quando estas foram utilizadas.

❖ O teste de migração de neutrófilos em bolsa de ar estéril mostrou que houve diferença significativa de liberação de citocinas no caso do estímulo positivo (LPS) quando da adição das frações aquosas de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*, com diminuição da liberação de citocinas pro-inflamatórias, demonstrando mais uma vez o efeito anti-inflamatório das duas Passifloras.

❖ Todos os resultados observados neste trabalho permitem concluir que estas duas espécies de Passifloras têm atividade cicatrizante e anti-inflamatória significativamente diversa dos sistemas empregados como controle e que podem constituir auxiliares importantes no preparo de futuros medicamentos para melhoria do processo de cicatrização.

Referências Bibliográficas

9. Referências bibliográficas

ABOURASHED, E.A.; VANDERPLANK, J.R.; KHAN, I.A. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants. I. Application to Passiflora flavonoids. **Pharmaceutical Biology**, v.40, n.2, p.81–91, 2002.

AKSNES, D.W.; STANDNES, A.; ANDEMEN, O.M.; Complete Assignment of the 'H and 13C NMR Spectra of Flavone and its A-Ring Hydroxyl Derivatives, **Magnetic Resonance in Chemistry**, vol. 34, p. 820-823, 1996.

ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R. **Flavonoids**: chemistry, biochemistry and applications. Roca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2006. 1212p.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an up date. **Blood**, v.93, n.5, p.1464-1476, 1999.

BERALDO, J.; KATO, E.T.M. Morfoanatomia de folhas e caules de *Passiflora edulis* Sims. Passifloraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.2, p.233-239, 2010.

BERLYN, G.P.; MIKSCHE, J.P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University Press, 1976. 334p.

BEZERRA, J.A.F.; CAMPOS, A.C.L.; VASCONCELOS, P.R.L.; NICARETA, J.R.; RIBEIRO, E.R.; SEBASTIÃO, A.P.M.; URDIALES, A.I.A.; MOREIRA, M.; BORGES, A.M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de anastomose colônica em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, suppl.3, p.16-25, 2006.

BLOTNIK, S.; PEOPLES, G.E.; FREEMAN, M.R.; EBERLEIN, T.J.; KLAGSBRUN, M. T lymphocytes synthesize and export heparing-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblast differential production and release by $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, n.8, p.2890-2894, 1994.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J., eds. **Herbal medicine**: expanded commission E monographs. Newton: Integrative Mecidine Communication, 2000. 519p.

BOECK, G. Current status of flow cytometry in cell and molecular biology. **International Review of Cytotoly**, v.204, p.239-298, 2001.

BOEIRA, J.M.; FENNER, R.; BETTI, A.H.; PROVENSI, G.; LACERDA, L.A.; BARBOSA, P.R.; GONZÁLEZ, F.H.; CORRÊA, A.M.; DRIEMEIER, D.; DALL'ALBA, M.P.; PEDROSO, A.P.; GOSMANN, G.; SILVA, J.; RATES, S.M. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, n.2, p.526-532, 2010.

BORREGAARD, N.; LOLLIKE, K.; KJELDSEN, L.; SENGELØV, H.; BASTHOLM, L.; NIELSEN, M.H.; BAINTON, D.F. Human neutrophils granules and secretory vesicles. **European Journal of Haematology**, v.51, n.4, p.187-198, 1993.

BRAFF, M.H.; BARDAN, A.; NIZET, V.; GALLO, R.L. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. **Journal of Investigative Dermatology**, v.125, n.1, p.9-13, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Renisus**: Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS.. 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30780. Acesso em: 09 fev. 2013.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J.V.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.4, p.902-908, 2007.

BUKATSCH, F. Bermerkungen zur doppelfärbung astrablausafranin. **Mikrokosmos**, v.61, n.8, p.255-257, 1972.

CARDOSO, C.R.; SOUZA, M.A.; FERRO, E.A.; FAVORETO JR., S.; PENA, J.D. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v.12, n.2, p.235-243, 2004.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.75, n.3, p.501-512, 2003.

CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E.H.; FIGUEIREDO, M.S.R.B.; FOLADOR, P.; DAMAZIO, R.G.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Flavonoids: prospective drug candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.8, n.13, p.1429-1440, 2008.

CERVI, A.C. *Passifloraceæ* do Brasil, Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. Madrid: Fontqueria XLV, 1997. p.34. Disponível em: http://bibdigital.rjb.csic.es/PDF/Fontqueria_45.pdf. Acesso em: 31 maio 2012.

CLARK, R.A.F.; HERSON, P.M. In: **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum Press, 1988. p.281-319.

COLETA, M.; BATISTA, M.T.; CAMPOS, M.G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M.D.; LIMA, T.C.M.; CUNHA, A.P. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of Passiflora edulis Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. **Phytotherapy Research**, v.20, n.12, p.1067–1073, 2006.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J.H.; MCCULLAGH, M. Study of *C*- and *O*-glycosylflavones in sugarcane extracts using liquid chromatography: exact mass measurement mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, n.3, p.483-490, 2008.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 1117p. [v.3. Farmacognosia experimental].

COSTA, A.M.; LIMA, H.C. Desarrollo tecnológico para uso de las *Passiflora*s silvestres como alimentos funcionales y medicinales. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE *PASSIFLORA*, 1, 2010, Neiva. **Memorias**. Neiva: Corporación Centro de Investigación para La gestión tecnológica de *Passiflora* del Departamento del Huila (CEPASS Huila)

y la Asociación Hortofrutícola del Colombia (OSOHORTOFRUCOL), 2010. CDRom, p.105-113.

CRONQUIST, A. **An Integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.

CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.V.; JUNQUEIRA, N.T.V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A.A., ed. **Maracujá**: produção, aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 104p. (Frutas do Brasil, 15).

DE-PARIS, F.; PETRY, R.D.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J.B.; KAPCZINSKI, F.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; SCHENKEL, E.P. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.21, n.1, p.5–8, 2002.

DER MARDEROSIAN, A.; BEUTLER, J.A. **The review of natural products®**. 3.ed. Saint Louis: Facts and Comparisons, 2002. p.547-550.

DHAWAN, K.S.; DHAWAN, S.A.; SHARMA, A. Passiflora: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, n.1, p.1–23, 2004.

DOMON, B.; COSTELLO, C.E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentation in FAB MS/MS spectra of glycoconjugates. **Glycoconjugate Journal**, v.5, n.4, p.397–409, 1988.

ENGELHARD, E.; TOKSOY, A.; GOEBELER, M.; DEBUS, S.; BRÖCKER, E.B.; GILLITZER, R. Chemokines IL-8, Groα, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leucocyte subsets in human wound healing. **American Journal of Pathology**, v.153, n.6, p.1849-1860, 1998.

FARMACOPÉIA Brasileira. 2.ed. 1959. Disponível em: http://www.crf-mt.org.br/arqs/materia/1469_a.pdf. Acesso em: 05 fev. 2013.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5.ed. Brasília: ANVISA, 2010. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm. Acesso em: 6 fev. 2013.

FISCHER, I.H. **Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da "morte prematura" do maracujazeiro, causada por *Nectria hematococca* e *Phytophthora parasítica***. Piracicaba, 2003. 48p. Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

GARROS, I.C.; CAMPOS, A.C.L.; TÂMBARA, E.M.; TENÓRIO, S.B.; TORRES, O.J.M.; AGULHAM, M.A.; ARAÚJO, A.C.F.; SANTIS-ISOLAN, P.M.B.; OLIVEIRA, R.M.; ARRUDA, E.C.M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, supl.3, p.55-66, 2006.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal of Leukocyte Biology**, v.69, n.4, p.513-521, 2001.

GOMES, C.S.; CAMPOS, A.C.L.; TORRES, O.J.M.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, A.T.R.; TENÓRIO, S.B.; TÂMBARA, E.M.; SAKATA, K.; MORAES, J.R.H.; FERRER, A.L.S. Efeito do extrato de *passiflora edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, supl.2, p.9-16, 2006.

GONÇALVES-FILHO, A.; TORRES, O.J.M.; CAMPOS, A.C.L.; TAMBARA-FILHO, R.; ROCHA, L.C.A.; LUNEDO, S.M.C.; BARBOSA, R.E.A.; BERNHARDT, J.A.; VASCONCELOS, P.R.L. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* (maracujá) na cicatrização de bexiga em ratos: estudo morfológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, suppl.2, p.3-8, 2006.

GOSMANN, G.; PROVENSI, G.; COMUNELLO, L.N. e RATES, S.M.K.; Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociencias**, v.9, supl.1, p.88-99, 2011.

GOULART, S.; MORITZ, M.I.; LANG, K.L.; LIZ R.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, n.2, p.346-353, 2007.

GRINNEL, F.; BILLINGHIAM, R.E.; BURGESS, L. Distribution of fibronectin during wound healing *in vivo*. **Journal of Investigative Dermatology**, v.76, n.3, p.181-189, 1981.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprouts and superficial loops of granulation tissue. I. Quantitative study of the vascular volume. **Revista da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v.1, n.4, p.6-8, 1987.

HARTLAPP, I.; ABE, R.; SAEED, R.W.; PENG, T.; VOELTER, W.; BUCALA, R.; METZ, C.N. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis *in vivo*. **FASEB Journal**, v.15, n.12, p.2215-2224, 2001.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.88, n.2, p.53-58, 2007.

HICKEY, L.J. Classification of the architecture of dicotyledonous leaves. **American Journal of Botany**, v.60, n.1, p.17-33, 1973.

JANG, S.; KELLEY, K.W.; JOHNSON, R.W. Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA***,* v.105, p.7534-9, 2008.

JAROSZESKI, M.J.; RADCLIFF, G. Fundamentals of flow cytometry. **Molecular Biotechnology**, v.11, n.1, p.37-53, 1999.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência à doenças. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18, 2004, Florianopolis. **Anais**. Jaboticabal: SBF, 2004b. 1CD-ROM.

KNIGHTON, D.R.; SILVER, I.A.; HUNT, T.K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surgery**, v.90, n.2, p.262-270, 1981.

LEÓN SARABIA, J.E.; ROSALES CLARES, V.P.; ROSALES CLARES, R.A.; PAVÓN HERNÁNDEZ, V. Actividad antiinflamatoria y cicatrizante del ungüento rectal de A*loe vera* L. (sábila). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.4, n.3, p.106-109, 1999.

LI, Q.M.; CLAEYS, M. Characterization and differentiation of diglycosyl flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. **Biological Mass Spectrometry**, v.23, n.7, p.406–416, 1994.

LIMA, C.R.; COSTA SILVA, J.H.; LYRA, M.M.A.; ARAÚJO, A.V.; ARRUDA, V.M.; DIMECH, G.S.; EVÊNCIO, L.B.; FRAGA, M.C.C.A.; LAFAYETTE, S.S.L.; WANDERLEY, A.G., Atividade cicatrizante e estudo toxicológico pré-clínico do fitoterápico Sanativo®. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.25, n.4, p.544-549, 2006.

LONZA. Limulus Amebocyte Lysate (LAL) – Kinetic-QCL. Disponível em: http://www.lonza.com/products-services/pharma-biotech/endotoxin-detection.asp. Acesso em: 22 jul. 2013.

LOPES, C. LYRA, J.L.; MARKUS, R.P.; MARIANO, P. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. **Journal of Pineal Research**, v.23, n.2, p.72-78, 1997.

LOPEZ-LAZARO, M.; Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin, ***Mini-Reviews in Medicinal Chemistry***, v. 9, p.31-59, 2009.

MA, Y.L.; CUYCKENS, F.; VAN DEN HEUVEL, H.; CLAEYS, M. Mass spectrometric methods for the characterisation and differentiation of isomeric O-diglycosyl flavonoids. **Phytochemical Analysis**, v.12, n.3, p.159–165, 2001.

MA, Y.L.; LI, Q.M.; VAN DEN HEUVEL, H.; CLAEYS, M. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.11, n.12, p.1357–1364, 1997.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970. 354p.

MARCH, R.E.; LEWARS, E.G.; STADEY, C.J.; MIAO, X.S, ZHAO, X.; METCALFE, C.D. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.248, n.1/2, p.61–85, 2006.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v.46, n.3, p.234-239, 1998.

MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982. 113p. (Biological techniques series).

MELETTI, L.M.M.; BRUCKNER, C.H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C.; MANICA, I., eds. **Maracujá**: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p.345-385.

MENEZES, J.M.T.; OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C.; BANZATO, D.A. Avaliação da taxa de pegamento de enxertos de maracujá-amarelo sobre espécies tolerantes à “morte prematura de plantas”. **Científica**, v.22, n.1, p.95-104, 1994.

MOLLÍNEDO, F. BORREGAARD, N.; BOXER, L.A. Novel trends in neutrophil structure, function and development. **Immunology Today**, v.20, n.12, p.537-539, 1999.

MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTO, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n.2, p.281–288, 2007.

MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor b stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.85, n.13, p.4894-4897, 1988.

ODONTUYA, G., HOULT, J.R.S., HOUGHTON, P.J., Antiinflammatory Effect of Luteolin and its Derived Glycosides, **Phytother. Res.** V.19, p. 782–786, 2005.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Ateneu, 2000. 412p. (Série Farmácia. Veterinária).

OLIVEIRA, J.C.; NAKAMURA, K.; CENTURION, M.A.P.C.; RUGGIERO, C.; FERREIRA, F.R.; MAURO, A.O.; SACRAMENTO, C.K. Avaliação de passifloráceas quanto à morte prematura de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., 1994, Salvador. **Anais**. Salvador: SBF, 1994. v.3, res.347, p.827.

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., 2004, Jaboticabal. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 2005. p.291-310.

OSTERDAHL, B-G, Chemical studies in Bryophytes, 17. A new Luteolin tetraglycoside from *Hedwigia ciliata*, **Acta Chem. Scandinavica B**, v. 30, p. 867-870, 1976.

PARK, J.E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **American Journal of Surgery**, v.187, n.5A, p.11S-16S, 2004.

PEREIRA, C.A.M.; VILEGAS, J.H.Y Constituintes químicos e farmacologia do gênero Passiflora com ênfase a *P. alata* Dryander, *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.3, n.1, p.1–12, 2000.

PEREIRA, C.A.M.; YARIWAKE, J.H.; MCCULLAGH, M. Distinction of the *C*-glycosylflavone isomer pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in source CID. **Phytochemical Analysis**, v.16, n.5, p.295–301, 2005.

PISOSCHI, A.M.; CHEREGI, M.C.; DANET, A.F. Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometrical approaches. **Molecules**, v.14, n.1, p.480-493, 2009.

POZZI, A.C.S. **Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonoides do "maracujá" (*Passiflora alata* e *Passiflora edulis*)**. São Carlos, 2007. 73p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo.

PRASAIN, J.K.; WANG, C.C.; BARNES, S. Serial review: flavonoids and Isoflavones (Photoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity - mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. **Free Radical Biology & Medicine**, v.37, n.9, p.1324–1350, 2004.

PROENÇA DA CUNHA, A. **Farmacognosia e fitoquímica**. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2009. 670p.

REHWALD, A.; MEIER, B.; STICHER, O. Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.69, n.3, p.153-158, 1994.

ROBINSON M.M.; ZHANG, X. **The World Medicines Situation 2011**: Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges. Geneva: WHO, 2011. 12p. Disponível em: http://digicollection.org/hss/documents/s18063en/s18063en.pdf. Acesso em: 25 de jan de 2013.

SALMON, J.K.; ARMSTRONG, C.A.; ANSEL, J.C. The skin as an immune organ. **Western Journal of Medicine**, v.160, n.2, p.146-152, 1994.

SANTOS, K.C.; KURTZ, S.M.T.F.; MULLER, S.D.; BIAVATTI, M.W.; OLIVEIRA, R.M.M.W.; SANTOS, C.A.M. Sedative and anxiolytic effects of methanolic extract from the leaves of *Passiflora actinia*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.4, p.565–573, 2006.

SCOTTI, L.; FERNANDES, M.B.; MURAMATSU, E.; EMERECIANO V.P.; TAVARES, J.F.; SILVA, M.S.; SCOTTI, M.T. ^{13}C NMR spectral data and molecular descriptors to predict the antioxidant activity of flavonoids, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 47, n. 2, apr./jun., p. 241-249, 2011.

SEILER, A.; VISAN, A.; BUESEN, R.; GENSCHOW, E.; SPIELMANN, H. Improvement of an *in vitro* stem cell assay for developmental toxicity: the use of molecular endpoints in the embryonic stem cell test. **Reproductive Toxicology**, v.18, n.2, p.231-240, 2004.

SENA, L.M.; ZUCOLOTTO, S.M.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P.; LIMA, T.C.M. Neuropharmacological activity of the pericarp of Passiflora edulis variety flavicarpa Degener: putative involvement of C-glycosylflavonoids. **Experimental Biology and Medicine**, v.234, n.8, p.976–975, 2009.

SHAPIRO, H.M. **Practical flow cytometry**. 3.ed. New York: Wiley-Liss, 1995. 542p.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v.22, n.1, p.94-103, 1999.

SILVA, G.A. **Estudo farmacognóstico de *Croton urucurana* baillon (Sangra D'agua)**. São Paulo, 1999. 285p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G., org. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6.ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2006. 1102p.

STAHL, E. **Dunnschicht-chromatographie**: ein laboratoriumshandbuch. 2.ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag,1967. 728p.

TAMURA, E.K.; JIMENEZ, R.S.; WAISMAM, K.; GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P.; MALPEZZI-MARINHO, E.A.; MARINHO, E.A.; FARSKY, S.H. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, n.3, p.478-485, 2009.

TERKELTAUB, R.A.; GINSBERG, M.H. Platelets and response to injury. In: CLARK, R.A.F.; HENSON, P.M., eds. **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum Press, 1998. p.149-163.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. **Bacterial Endotoxins/Pyrogens**. 1985, Disponivel em: http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/InspectionTechnicalGuides/ucm072918.htm. Acesso em: 15 jul. 2013.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**: a thin layer chromatography atlas. 2.ed. Berlin: Springer-Verlag; New York: Springer, 1996. 384p.

WERNER. S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v.83, n.3, p.835-870, 2003.

WOLFF, K.; GOLDSMITH, L.A.; KATZ, S.I.; GILCHREST, B.A.; PALLER, A.S.; LEFFELL, D.J. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 7.ed. New York: McGraw Hill Medical, 2008. 2816p.

ZERAIK, M.L.; YARIWAKE, J.H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **Microchemical Journal**, v.96, n.1, p.86–91, 2010.

ZHOU, X., PENG, J., FAN, G., WU, Y. - Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase, **Journal of Chromatography A**, v. 1092 , p. 216–221, 2005.

ZUCOLOTTO, S.M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F.H.; RAMOS, F.A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E.P. Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American Passiflora Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, v.23, n.3, p.232–239, 2012.

XAGORARI, A.; PAPAPETROPOULOS, A.; MAUROMATIS, A.; ECONOMOU, M.; FOTSIS, T.; ROUSSOS, C.; Luteolin inhibits an endotoxinstimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. **J. Pharmacol. Exp**. **Ther.**, v. 296, p.181-187, 2001.

Data:

Ângela Rita de Almeida Elfriede M. Bacchi

Anexos

Universidade
Cruzeiro do Sul

www.cruzeirodosul.edu.br

Anália Franco
Av. Regente Feijó, 1295
03342 000 São Paulo SP
T F 55 11 2672 6200

Pinheiros
R. Butantã, 285
05424 140 São Paulo SP
T F 55 11 3030 4000

Liberdade
R. Galvão Bueno, 868
01506 000 São Paulo SP
T F 55 11 3385 3000

São Miguel
Av. Dr. Ussiel Cirilo, 225
08060 070 São Paulo SP
T F 55 11 2037 5700

Comitê de Ética

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética da Universidade Cruzeiro do Sul **APROVOU** o protocolo do projeto de pesquisa intitulado ***"Ação da Passiflora Edulis Sims e Passiflora Setacea D.C. nos mecanismos de cicatrização de feridas em ratos"***, protocolo CE/UCS-022/2013, apresentado por ***Elaine Hatanaka***.

São Paulo, 14 de Maio de 2013.

Prof. Dr. **José Angelo Barela**
Presidente do Comitê de Ética
Universidade Cruzeiro do Sul

Observação: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a Comissão de Ética, o relatório final sobre a pesquisa (RESOLUÇÃO DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE Nº 196, 10/10/1996, inciso 9.2, letra "c")

Reconhecida pela Portaria Ministerial nº 893, D.O.U. 25/06/1993.

Universidade
Cruzeiro do Sul

www.cruzeirodosul.edu.br

Anália Franco
Av. Regente Feijó, 1295
03342 000 São Paulo SP
T F 55 11 2672 6200

Pinheiros
R. Butantã, 285
05424 140 São Paulo SP
T F 55 11 3030 4000

Liberdade
R. Galvão Bueno, 868
01506 000 São Paulo SP
T F 55 11 3385 3000

São Miguel
Av. Dr. Ussiel Cirilo, 225
08060 070 São Paulo SP
T F 55 11 2037 5700

Comitê de Ética

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética da Universidade Cruzeiro do Sul **APROVOU** o protocolo do projeto de pesquisa intitulado ***"Ação da Passiflora Edulis Sims e Passiflora Setacea D.C. na função de neutrófilos humanos"***, protocolo CE/UCS-207/2013, apresentado por ***Elaine Hatanaka***.

São Paulo, 20 de Janeiro de 2014.

Prof. Dr. **José Angelo Barela**
Presidente do Comitê de Ética
Universidade Cruzeiro do Sul

Observação: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a Comissão de Ética, o relatório final sobre a pesquisa (RESOLUÇÃO DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE Nº 196, 10/10/1996, inciso 9.2, letra "c")